

L- UND D-AMINOSÄURE-OXIDASE AUS ORGANEN DER SCHLANGEN TROPIDONOTUS NATRIX UND CERBERUS RHYNCHOPS (COLUBRIDAE)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde

dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gisela Wolfram
aus Berlin

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

L- UND D-AMINOSÄURE-OXIDASE AUS ORGANEN DER SCHLANGEN TROPIDONOTUS NATRIX UND CERBERUS RHYNCHOPS (COLUBRIDAE)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde

dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gisela Wolfram
aus Berlin



1. Referent: Prof. Dr. K. Urich
2. Referent: Prof. Dr. K. Graszynski

Tag der mündlichen Prüfung: 29.9.1976

Tag der Promotion:

Meiner lieben Mutter in Dankbarkeit gewidmet.

Diese Arbeit wurde am Institut für Tierphysiologie der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Urich, jetzt Institut für Zoologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, durchgeführt.

Ich bin Herrn Prof. Dr. K. Urich für die Anregung und Anleitung zur kritischen Abfassung dieser Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt ebenfalls den übrigen Institutsangehörigen, besonders meinen Mit-Doktoranden für zahlreiche anregende Diskussionen.

Für die Untersuchungen standen Leihgaben der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Herrn Prof. Dr. K. Urich zur Verfügung.

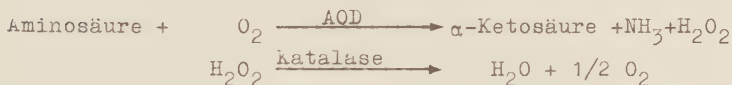
ABKÜRZUNGEN	1
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	8
2.1. Tiermaterial	8
2.2. Reagenzien	8
2.3. Präparation der Gewebe	9
2.4. Acetontrockenpulverpräparat	9
2.5. Bestimmung der Enzymaktivitäten	9
2.5.1. Manometrische Bestimmung	10
2.5.2. Bestimmung aliphatischer α -Ketosauren	11
2.5.3. Bestimmung aromatischer α -Ketosauren	11
2.5.4. Bestimmung in Polyacrylamid-Gelen	12
2.6. Proteinbestimmung	12
2.7. Ammonsulfatfällung	13
2.8. Ionenaustauscher-Chromatographie	13
2.9. Diskelektrophorese	14
2.10. Enzymextraktion aus Polyacrylamid-Gelen	15
2.11. Isolierung des Coenzym der L-AOD	15
2.12. Enzymatischer Test auf Flavin-adenin-dinucleotid	15
2.13. Dialyse gegen Kaliumbromid	16
2.14. Dünnschichtchromatographie	16
2.15. Molekulargewichtsbestimmung	17
2.16. Fehlerrechnung	18
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	19
3.1. Stabilität und Puffersysteme	19
3.2. Einfluß von Sauerstoff	20
3.3. Organverteilung	21
3.4. Dissoziationsverhalten	27
3.5. Elektrophoretische Eigenschaften	29
3.6. Molekulargewicht	39
3.7. Anreicherung der L-Aminosäure-Oxidase	45
3.8. Charakterisierung der L-AOD	53
3.8.1. Reaktionskinetik	53
3.8.2. Substratspezifität	62
3.8.3. Prosthetische Gruppe	69
4. SCHLUBBETRACHTUNG	72
5. ZUSAMMENFASSUNG	74
LITERATURÜBERSICHT	76
LEBENS LAUF	

ABKÜRZUNGEN

L-AOD	= L-Aminosäure-Oxidase
D-AOD	= D-Aminosäure-Oxidase
Bis	= N,N'-Methylenbisacrylamid
DEAE-C	= Diäthylaminoäthylcellulose
EDTA	= Äthylendiamintetraacetat
FAD	= Flavin-adenin-dinucleotid
FMN	= Flavinmononucleotid= Riboflavin-5'-phosphat
GOD	= Glucose-Oxidase
LDH	= Lactatdehydrogenase
MG	= Molekulargewicht
NADH	= Nicotinsäureamid-adenin- dinucleotid, reduziert
POD	= Peroxidase
TCE	= Trichloressigsäure
Tris	= Tris(hydroxymethyl)- aminomethan

1. EINLEITUNG

Aminosäuren als Abbauprodukte der Proteine werden im Organismus teilweise resorbiert und zur Bildung neuer Proteine verwendet, zum überwiegenden Teil aber weiter abgebaut und dem Citronensäurecyclus zugeführt. Die oxidative Desaminierung unter Verwendung von molekularem Sauerstoff ist eine der Abbaumöglichkeiten für Aminosäuren. Diese im Tierreich weitverbreitete, vom Organismus aber wenig benutzte Reaktion wird durch die Aminosäure-Oxidasen katalysiert:



Man unterscheidet zwei stereospezifische Oxidasen, L-Aminosäure-Oxidase (EC 1.4.3.2 L-Aminosäure: Sauerstoff-Oxidoreduktase, desaminierend) und D-Aminosäure-Oxidase, (EC 1.4.3.3 D-Aminosäure: Sauerstoff-Oxidoreduktase, desaminierend).

Erstmals wies KREBS (1935) an Gewebeschnitten die Oxidation von Aminosäuren zu ihren entsprechenden α -Ketosäuren und Ammoniak nach. BLANCHARD und Mitarbeiter (1944) fanden L-AOD bei Säugern nur in Rattenniere und -leber in nennenswerter Aktivität. Das Enzym hat die extrem niedrige Wechselzahl von 6 Mol L-Leucin pro Mol FMN·min und oxidiert L- α -Hydroxysäuren wesentlich schneller als die Aminosäuren; L-Lactat wird mit 4facher Aktivität umgesetzt (BLANCHARD et al. 1945). Diese Ergebnisse wurden von NAKANO und DANOWSKI (1966) und NAKANO et al. (1967) an kristalliner L-AOD be-

stätigt. Sie weisen daraufhin, daß dem Enzym keine große Bedeutung im Aminosäurestoffwechsel zukommen kann.

In histochemischen Untersuchungen wurde die L-AOD in der Zelle lokalisiert und der Versuch unternommen, auf ihre Funktion zu schließen (De DUVE und BAUDHUIN 1966; ALLEN und BEARD 1965; ALLEN et al. 1965; BEARD und ALLEN 1968; MÜLLER et al. 1968). Das Enzym findet sich sowohl in löslicher Form als auch partikelgebunden in der Mitochondrienfraktion und den Peroxisomen (NAKANO et al. 1967, 1969; DOMENECH und BLANCO 1967).

DOMENECH et al. (1973) unterscheiden zwei molekulare Formen von L-AOD in Rattennieren; das Isoenzym der "schweren" mitochondrialen Fraktion hat zwar andere Hitzestabilität und Nettoladung, aber die gleichen kinetischen Eigenschaften wie die Enzyme in den übrigen zellulären Fraktionen. Beide Formen von L-AOD sind Ladungsisomere in der Definition nach HEDRICK und SMITH (1968) mit einem Molekulargewicht von 310 000 (NAKANO et al. 1968a), d.h. 6 Mole FMN/Enzymmolekül. CROMARTIE und WALSH (1975a und b) fanden dagegen eine Tetramerenstruktur mit gleichgroßen Untereinheiten, wahrscheinlich verschiedener Ladung und einem Molekulargewicht von 200 000. Die größte Bande der drei Isoenzyme der löslichen Fraktion und die einzelne Bande des mitochondrialen Enzyms haben keine unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeiten auf der Gelelektrophorese; es wird darauf hingewiesen, daß diese L-AOD der Rattenniere nur ein FMN-Molekül auf zwei Untereinheiten besitzt.

Zur gleichen Zeit, als die L-Aminosäure-Oxidase der Säuger entdeckt wurde, wies ZELLER (1944a) einen anderen Typ von L-AOD im Gift zahlreicher Schlangenarten nach. Diese Oxidase, von ZELLER und MARITZ (1945a) Ophio-L-Aminosäure-Oxidase genannt, zeichnet sich durch außergewöhnlich hohe Aktivität aus (ZELLER und MARITZ 1944b). L-Prolin, N-Methyl-L-Aminosäuren und L- α -

Hydroxysäuren, sehr gute Substrate des Säugerenzyms, werden nicht umgesetzt (ZELLER und MARITZ 1944, 1945a und b; ZELLER et al. 1946; ZELLER 1948; ZELLER 1951). Auch in den Organen von giftigen und ungiftigen Schlangen wiesen ZELLER und Mitarbeiter (1946) L-AOD-Aktivität nach; sie sind eine der wenigen Arbeitsgruppen, die sich mit dem Enzym in Schlangenorganen beschäftigt haben. Damals wurden Lunge, Leber, Niere und Erythrocyten der Ringelnatter Tropidonotus natrix, der Würfelnatter T. tessellatus sowie der Kreuzotter Vipera berus und der Aspiviper V. aspis auf L-AOD untersucht; Aktivität konnte in allen vier Arten nachgewiesen werden. Diese Oxidase aus Schlangenorganen ähnelt offenbar dem in Giften gefundenen Enzym. Außer diesen wenigen direkten Hinweisen auf L-AOD in Schlangenorganen gibt es noch einige indirekte Hinweise auf das Enzym; so wurde noch in der Leber von Bothrops jararaca L-AOD gefunden (VILLELA et al. 1955); Flavinmessungen des Plasmas deuten auf proteingebundene Flavine hin, die wahrscheinlich als Coenzym der L-AOD vorliegen, da Xanthin-Oxidase nur in der Leber, nicht aber im Plasma oder Gift zu finden war. VILLELA und THEIN (1967) fanden ebenfalls proteingebundene Flavine in Serum und Haut von der Python und von Cerberus rhynchops.

L-AOD mit einer Wechselzahl von 6 000 Mol L-Leucin pro Mol FAD.min wurde aus dem Gift der Mokassinschlange Agkistrodon piscivorus gewonnen (SINGER und KEARNEY 1950a,b), sowie aus den Giften der Klapperschlange Crotalus adamanteus (WELLMER und MEISTER 1960), der Sandotter Vipera ammodytes (ZWISLER 1965; KURTH und AURICH 1973) und der Palästina-Viper Vipera palestinae (SHAHAM und BDOLAH 1973) in hochgereinigter und kristalliner Form isoliert.

Während für das Säugerenzym wenige Untersuchungen vorliegen, konnte das Crotalus-Enzym als Ausgangspunkt

zur Feinstrukturanalyse eines Enzymproteins und zur Klärung enzymkatalysierter Reaktionen als Modell eines Flavinenzyms herangezogen werden (WELLNER und MEISTER 1961; MARCUS und FEELEY 1962; WELLNER 1966; PAIK und KIM 1967; De KOK und VEEGER 1967, 1968; KOSTER und VEEGER 1968; De KOK und RAWITCH 1969; MASSEY und CURTI 1967; MASSEY et al. 1968, 1969a und b; CURTI et al. 1968; WELLNER und HAYES 1968; HAYES und WELLNER 1969; PORTER und BRIGHT 1969, 1972a u.a.). Trotz dieser vielen Untersuchungen konnte die Stoffwechselfunktion nicht geklärt werden; erste Vermutungen, die L-AOD sei an der toxischen Wirkung der Schlangengifte beteiligt (ZELLER 1948) durch Aktivierung von Proteasen, lassen sich nicht bestätigen (RUSSELL 1963; KOCHOLATY et al. 1971). DIMITROV (1971) berichtet andererseits von einem Assoziation-Dissoziationsgleichgewicht zwischen proteolytischen Enzymen, L-AOD und weiteren Giftkomponenten von Vipera russelli. Weiße Gifte haben keine Proteasen (DIMITROV und KANKONKAR 1968) und keine L-AOD (ZELLER 1948; JIMENEZ-PORRAS 1970). Während verschiedener Sekretionsphasen der Giftdrüse verändert die L-Aminosäure-Oxidase ihre Lage im supranuclearen Bereich der Drüsenzelle nicht (BROWN 1974). Zwischen den Enzymen verschiedener Schlangenarten bestehen keine grundlegenden Unterschiede; außer den natürlichen Aminosäuren werden vierzig weitere aromatische Aminosäuren, die in ortho- meta- oder para-Stellung substituiert sind, umgesetzt (BENDER und KREBS 1950; ZELLER et al. 1965, 1974).

Bei Wirbeltieren gibt es noch weitere L-Aminosäure-Oxidasen. Aus der Leber des Truthahns wurde ein Enzym isoliert, das hauptsächlich basische Aminosäuren oxidiert (BOULANGER und OSTEUX 1956); in Hühnerembryonen gibt es eine L-AOD, die Histidin desaminiert (CORRIGAN 1972).

L-Aminosäure-Oxidasen gibt es in den übrigen Tierstämmen in verwirrender Anzahl, löslich oder partikelgebunden, auch durch Magnesium-Ionen aktivierbar; L-AOD kommt vor bei parasitären Plathelminthes (Myxenolepis sp.: DAUGHERTY 1955; Calliosotrium verticillatum: FISHER und STARLING 1970), bei marinen Mollusken (Mytilus sp.: BLASCHKO und HOPE 1956; HOPE et al. 1967; Cardium tuberculatum: GLAHN et al. 1955; ROCHE et al. 1952, 1959), bei Crustaceen (Van THOAI et al. 1953), bei Insekten (Bombyx mori: KOTAKA 1963) und bei Mikroorganismen (Proteus vulgaris: STUMPF und GREEN 1944; DUERRE und CHAKRABARTHY 1975; Corynebacterium: COUDERT und VANDECASTEBLE 1975). Wahrscheinlich gibt es auch eine L-Aminosäure-Oxidase in Viren; MECHER und MASSZI (1969) berichten über das Vorhandensein von L-AOD geringer Spezifität, aber inaktiv gegenüber L-Prolin, im Serum von Patienten mit blasenbildenden Hautkrankheiten.

Die Gruppe der D-Aminosäure-Oxidasen ist dagegen einheitlicher in ihren Eigenschaften und weit verbreitet. Wohl jeder Metazoenorganismus synthetisiert D-AOD (CORRIGAN 1972). Das Enzym ist bei Säugern in Niere und Leber in größerer Aktivität vorhanden (im Hammel: NEGELEIN und BRÖMEL 1939; BENDER und KREBS 1950; im Schwein: MASSEY et al. 1961; HENN und ACKERS 1969; im Rind: HORIIKE und MIYAKE 1971). D-AOD gibt es bei Insekten (CORRIGAN et al. 1963) und Mollusken (BLASCHKO und HAWKINS 1952).

Ein weitere Typ von D-Aminosäure-Oxidase, D-Aspartat-Oxidase (EC 1.4.3.1 D-Aspartat: Sauerstoff-Oxidoreduktase, desaminierend), streng spezifisch für Monoamino-dicarbonsäuren, wurde isoliert aus der Kaninchenniere (DIXON und KENWORTHY 1967), der Schweinniere (De MARCO und CRIFO 1967), der Rinderniere

(RINALDI 1971), aus Cephalopoden (ROCCA und GHIRETTI 1958) und aus Crustaceen (URICH 1968). Das Enzym ist in allen Lebern und Nieren der gebräuchlichsten Labortiere zu finden (De MARCO et al. 1969).

Beide Oxidasen wurden auch im Gehirn von Säugern gefunden (NEIMS et al. 1966; De MARCHI 1969; YUSKO 1973); beide Oxidasen sind Flavinproteine mit FAD als prosthetischer Gruppe (WARBURG und CHRISTIAN 1938a, b; NEGELEIN und BRÖMEL 1939; MASSEY et al. 1961; D'ANIELLO und ROCCA 1972; YUSKO und NEIMS 1973).

Ebenso wie das kristalline Schlangengiftenzym ist D-AOD aus Schweinenieren wegen laufender Verbesserung der Reinigungsschritte (YAGI 1962b; YAGI et al. 1967, 1970d; YAGI 1971b; TU et al. 1973), wegen der Fähigkeit, sehr leicht in Apoenzym und Coenzym zu dissoziieren, wegen ebenso leichter Rekonstruktion des Holoenzym (ANTONINI et al. 1966; FONDA und ANDERSON 1968b; KUBO et al. 1958; MASSEY und CURTI 1966; WALAAS und WALAAS 1956; YAGI et al. 1959; YAGI und OZAWA 1962a, 1964a) und wegen der Kristallisation eines purpurnen Intermediärprodukts (YAGI und OZAWA 1964b) Gegenstand zahlreicher, kinetischer Untersuchungen geworden (BRUNORI et al. 1971; FONDA und ANDERSON 1967, 1968a; HENN und ACKERS 1969; HORIIKE et al. 1974; de KOK und VEEGER 1967; MASSEY et al. 1965, 1968, 1969; MIZON et al. 1969; NAOI et al. 1973; PALMER und MASSEY 1968; PORTER und BRIGHT 1972b; PORTER et al. 1972; SHIGA und SHIGA 1971; SHIGA et al. 1973; TU und McCORMICK 1973; YAGI et al. 1967, 1970a, b, c, 1973, 1974; YAGI 1971a, b; WALSH et al. 1971). Die physiologische Bedeutung des Enzyms blieb unklar; naheliegend ist die Annahme einer Entgiftungsfunktion der D-AOD durch den Abbau sterisch falscher Aminosäuren (CORRIGAN 1972).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit L- und D-Aminosäure-Oxidase aus Organen der Species Tropidonotus

matrix und Ceroerus rhynchops. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der L-AOD, da es wünschenswert erschien, das L-Enzym aus Schlangenorganen genauer zu charakterisieren als es von der Arbeitsgruppe um ZELLEK getan worden ist.

Die Untersuchungen wurden an Acetontrockenpulverpräparaten und angereichertem L-Enzym durchgeführt. Mit der elektrophoretischen Analyse verschiedener Organe soll zur Frage der organspezifischen Enzymausstattung beigetragen werden. Die Bestimmung einiger kinetischer Eigenschaften, die Bestimmung des Molekulargewichts sowie die Untersuchung der Coenzym-Enzymproteinbindung soll die phylogenetische Stellung der Organ-L-AOD innerhalb von Schlangengift- und Säugerorganenzym klären.

Die bisher noch nicht beschriebene D-Aminosäure-Oxidase der Schlangenorgane erwies sich dabei sehr hinderlich; es entstand sogar zeitweilig der Eindruck, L- und D-Aminosäuren würden von dem gleichen Enzym oxidiert. Durch einige unter gleichen Bedingungen an käuflicher L-AOD (Crotalus adamanteus-Gift) und D-AOD aus Schweinenierengewebe durchgeführte Untersuchungen soll die Vergleichbarkeit der für beide Enzyme aus Schlangenorganen ermittelten Eigenschaften mit Literaturwerten überprüft werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten die Ringelnatter, Tropidonotus natrix = Natrix natrix (aglyph) und die Hundskopf-Wassertrugnatter, Cerberus rhynchops (opisthoglyph); sie sind beide Vertreter der Familie Colubridae. Zur Verfügung standen ausgewachsene männliche und weibliche Tiere, die von der Firma Behnke (Berlin) und vom Schlangenpark Maggia (Schweiz) bezogen worden waren.

2.2. Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien waren von p.a.-Qualität und wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer, Mannheim(o-Dianisidin-HCl, Katalase, NADH₂, Peroxidase, Glucose-Oxidase, Lactatdehydrogenase); Calbiochem, Los Angeles (D-Prolin, Phenylpyruvat, L- α -Hydroxy-iso-capronsäure, L-Aminosäure-Oxidase aus Crotalus adamanteus-Gift); Eastman Organic Chemicals (3-Hydrazin-chinolin-HCl); Fluka, Schweiz (4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure, 3-Indolylbrenztraubensäure, 4-Methyl-2-oxo-pentansäure, α -Keto-iso-capronsäure, L-Norvalin); Merck, Darmstadt (L-Ornithin, Pyruvat); Serva, Heidelberg (DEAE-Cellulose, FAD, FMN, Riboflavin, Polyacrylamid); Schuchardt, München (D-Aminosäure-Oxidase aus Schweinenieren); Sigma, St.Louis (L-,D-Alanin, L-Arginin L-,D-Asparginsäure, L-,D-Aspartat, L-Cystein, L-,D-Cystin, L-,D-Glutaminsäure, L-Glutamat, L-,D-Histidin-HCl, L-Hydroxyprolin, L-,D-Isoleucin, L-Lysin, L-,D-Methionin, D-Norleucin, L-,D-Phenylalanin, L-Prolin, L-,D-Serin, L-,D-Threonin, L-,D-Tryptophan, L-,D-Tyrosin, L-,D-Valin, Glycin, N-Methyl-D,L-Leucin).

2.3. Präparation der Gewebe

Die Tiere wurden bis zu 30 min in einer Tiefkühltruhe bei -30°C belassen, ohne total Durchzufrieren, und durch Dekapitieren getötet. Die Organe wurden schnell entnommen. Da der Darmkanal bei beiden Arten unterschiedlich fest mit der Körperwand verwachsen ist, wurde der Darmtrakt von Tropidonotus natrix im Bereich kaudaler Magen bis Harnblase, bei Cerberus rhynchops zwischen Speiseröhre und Magen präpariert, aufgeschnitten und von anhaftenden Kotballen mit Leitungswasser gereinigt. Alle Organe wurden tiefgefroren und innerhalb von drei Tagen zu Acetontrockenpulver nach URICH (1968) verarbeitet.

2.4. Acetontrockenpulverpräparat

Die Organe wurden mit 8 Volumen eiskaltem Aceton p.a. im Ultra-Turrax (Fa. Janke & Kunkel, Staufen) 3 min homogenisiert, bei Zimmertemperatur 1 h stehengelassen, dekantiert und mit weiteren 2,5 Volumen eiskaltem Aceton p.a. vermischt. Nach 30 min wurde mit einer G 4-Glasnutsche abgesaugt und das Präparat im Exsikkator mit Wasserstrahlpumpe bei Zimmertemperatur getrocknet, gut pulverisiert und bei 4°C im Exsikkator aufbewahrt. Wenn nicht anders angegeben, wurde ein Teil Acetontrockenpulver mit 9 Teilen 66,7 mM Tris-HCl pH 8,0 (37°C) 1 h bei 4°C eluiert und 30 min bei 20 000 g in einer Eispirouette der Fa. Phywe, Göttingen zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt, Reinigungsstufe I) wurde sofort weiterverarbeitet.

2.5. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die spezifische Aktivität der Aminosäure-Oxidasen wird angegeben in nMol (10^{-9} Mol) umgesetztes Substrat pro mg Protein und Minute; das entspricht Tausendsteln der internationalen Einheit (1 U = 1 $\mu\text{Mol/min}$), also

mU/mg Protein. Die Konzentrationen der Komponenten in den Bestimmungsansätzen bedeuten Endkonzentrationen (mMol/Liter).

2.5.1. Manometrische Messung

Die L- und D-Aminosäure-Oxidasen wurden manometrisch nach UMBREIT et al. (1957) in Mikro-Warburg-Einheiten von etwa 2 ml Gesamtvolumen (Braun, Melsungen) bestimmt; 100 % Sauerstoff als Gasphase. Alle Komponenten wurden in 66,7 mM Tris-HCl pH 8,0 (37°) gelöst und der pH genau eingestellt; die Temperaturabhängigkeit des Tris-Puffers, bei RAUEN (1964) und KLEINZELLER (1965) mit $+0,02 \text{ pH}/\Delta T -1^\circ\text{C}$ angegeben, wurde berücksichtigt. Im Standardansatz für L-Aminosäure-Oxidase aus Schlangenorganen und Gift lagen folgende Endkonzentrationen vor: 66,7 mM Tris-HCl pH 8,0, 7 mM L-Phenylalanin, 30 U Katalase, 100 μl L-AOD im Gesamtvolumen von 270 μl . Im Zentralgefäß befanden sich 20 μl 10% KOH, gestartet wurde mit 50 μl L-Aminosäure aus dem Seitengefäß; die Messung erfolgte bei 37°C 1 h lang, Schüttelfrequenz 140/min.

In Gegenwart von Katalase entspricht dem Umsatz von 1 mMol Substrat der Verbrauch von $1/2$ mMol bzw. 11,2 μl O_2 (s. Einleitung S.1). Schlangengifte enthalten keine Katalase, dagegen wurde sie in allen Versuchstierorganen mit dem Boehringer-Test nachgewiesen; Niere von Tropidonotus natrix enthält ca. 780 mU/mg Protein. Um auch bei den Anreicherungs-schritten für L-AOD den Katalaseüberschuß zu gewährleisten, wurde im Standardansatz stets Katalase zugesetzt; da Katalase Wasserstoffperoxid umsetzt, wird dadurch die Weiteroxidation der entstehenden Ketosäuren verhindert.

Der Standardansatz für D-Aminosäure-Oxidase enthielt außerdem 10^{-4} M FAD und 14 mM D-Phenylalanin. Die

Substratkonzentration entspricht dabei nicht optimalen Bedingungen, wurde aber zum besseren Vergleich mit der L-AOD aus Schlangenorganen beibehalten, wenn nicht anders vermerkt wird.

2.5.2. Bestimmung der aliphatischen α -Ketosauren und α -Hydroxysauren

Die Bestimmung erfolgte nach ROBINS et al. (1956) und WALDMAN und BURCH (1963), neuerdings referiert in COLOWICK und KAFLAN (1971): 200 μ l des incubierten Warburg-Ansatzes wurden mit 200 μ l 20% TCE deproteinisiert und zentrifugiert. Zu 200 μ l Überstand wurden 400 μ l 0,5 mM 3-Hydrazin-chinolin-HCl pH 1,8 bis 2,0 zugesetzt, 30 min bei 37°C incubiert und 2 ml 0,01 N HCl zugefügt. Die Extinktion wurde bei 305 nm im Zeiss-Spektrophotometer PMQ II gegen einen Reagenzien-leerwert gemessen und die entsprechende Menge einer mit käuflichen α -Ketosauren erstellten Eichkurve entnommen (0,100 E $\hat{=}$ 12 nMol Pyruvat bzw. 16 nMol α -Ketoiso-capronat/Ansatz). Gegenüber der Bestimmung als 2,4-Dinitrophenylhydrazon ist diese Methode 10000fach empfindlicher; im Gegensatz zur klassischen, manometrischen Methode lassen sich größere Meßreihen gleichzeitig untersuchen.

2.5.3. Bestimmung der aromatischen α -Ketosauren

Die Bestimmung der aromatischen Ketosauren wurde modifiziert nach LIN (1958) und WELLNER (1960) durchgeführt. Sie beruht auf der starken Absorption des Borat-Enol-Komplexes im UV-Bereich; Arsenat stabilisiert dabei die Enolform der α -Ketosaure.

200 μ l des incubierten und deproteinisierten Warburg-Ansatzes werden mit 1 M Borsäure in 2 M Natriumarsenat

pH 6,5 versetzt und 30 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Extinktion wurde für Phenylpyruvat bei 300 nm, für p-Hydroxyphenylpyruvat bei 310 nm und für β -Indolylpyruvat bei 332 nm im Zeiss-Spektrophotometer gemessen und die Menge einer mit käuflichen Ketosäuren erstellten Eichkurve entnommen (0,100 E $\hat{=}$ 36 nMol Phpyr, 35 nMol Hy-Phpyr, 50 nMol β -Indolylpyr).

2.5.4. Bestimmung der Enzymaktivitäten in Polyacrylamid-Gelen

Aminosäure-Oxidase-spezifische Anfärbung erfolgte in Anlehnung an ZWISLER (1964) mit dem Leukofarbstoff o-Dianisidin-HCl nach folgendem Reaktionsschema:



DH₂ = Leukofarbstoff

D = oxidierteter Farbstoff

Das Färbemedium bestand aus folgenden Komponenten:
0,5 ml POD (2mg/10 ml); 0,5 ml o-Dianisidin-HCl (1 mg/10 ml); 5 mM Aminosäure; 66,7 mM Tris-HCl pH 8; Gesamtvolumen: 3 ml.

Im übrigen ist die Reagenzienmenge nicht kritisch, solange die angefärbten Gele nur qualitativ ausgewertet werden. Die Incubationszeit betrug für L-AOD (Schlangengift) und D-AOD (Säuger) 10 min, D- und L-AOD (Schlangenorgan) wurden bis zu 2 h bei 37°C incubiert. Differenzierte Gele wurden in 7% Essigsäure aufbewahrt.

2.6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY et al. (1951) in COWGILL und PARDEE (1957) mit dem FOLIN-CIOCALTEU-

Phenolreagenz (Merck, Darmstadt) unter Benutzung einer Eichkurve, die für kristallines Rinderserumalbumin (Sigma) bei 750 nm erstellt worden war.

Die elektrophoretisch auf Polyacrylamid-Gel erzeugten Proteinbanden wurden nach MAURER (1968) mit Amidoschwarz 10 B in 7% Essigsäure oder mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva) in 12,5% Schwefelsäure qualitativ nachgewiesen und in 7% Essigsäure fixiert.

2.7. Ammonsulfatfällung

Vorversuche zur Anreicherung der L-AOD ergaben zwischen 30 und 55 % Ammonsulfatsättigung eine gute Ausbeute und Reinigung. Die notwendigen Ammonsulfatmengen wurden nach dem Nomogramm von DI JESO (1968) für 0°C bestimmt und in fester Form zugegeben. Der pH wurde durch 2 N Ammoniak konstant auf pH 8,0 gehalten; die Fällungen wurden mindestens 2 Stunden bei 4°C aufgehoben; zentrifugiert wurde 30 min bei 20 000 g.

2.8. Ionenaustauscher-Chromatographie

Benutzt wurde DEAE-Cellulose der Fa. Serva, Heidelberg mit einer Kapazität von 0,75 mÄqu./g Trockengewicht. Als Äquilibrationspuffer diente 5 mM Tris-HCl/1 mM EDTA pH 8,0 (37°C), gegen den auch das Untersuchungsmaterial der 1. Ammonsulfatfällung dialysiert worden war. Bei einer Säulengröße von 1,8 x 15 cm betrug die Durchflusgeschwindigkeit 15 ml/h. Die Füllung der Säule erfolgte nach DETERMANN (1967). Aufgeteilt in mehrere Proben von 5 bis 15 mg Protein/ml wurde der Extrakt auf die Säulen gebracht. Durch Vorwäsche mit dem Auftragspuffer 5 mM Tris-HCl/1 mM EDTA pH 8,0 wurde nicht-enzymatisches Protein abgetrennt. Das Enzym wurde in Stufenelution mit 100 mM Tris-HCl/1 mM EDTA pH 8,0 eluiert. Das Eluat wurde mit Hilfe eines LKB Uvicord mit

angeschlossenem Schreiber bei 254 nm auf seine Lichtdurchlässigkeit kontrolliert und mittels eines LKB Ultrarac automatisch fraktioniert; die Versuchsanordnung stand in einem Chromatographieschrank bei 4°C. Die Fraktionen eines Proteinpeaks wurden vereinigt, mit festem Ammonsulfat bei 60 % ausgefällt und durch Diskelektrophorese analysiert. In ausgefälltem Zustand hält sich das Enzym mehrere Wochen ohne deutlichen Aktivitätsverlust bei 4°C.

2.9. Diskelektrophorese

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese in der Theorie nach ORNSTEIN (1964) und DAVIES (1964) wurde nach MAURER (1968) durchgeführt. Das anodische Puffersystem Nr.1 mit Konzentrierung bei pH 8,3 und Trennung bei pH 9,0 ergab die besten Trennschärfen; die Analyse erfolgte an 5 - 7,5 - 17 - und 30% Gel. Auf Sammel- und Probengel konnte verzichtet werden, die Trennschärfe wurde nicht beeinflusst. Bei einem Geldurchmesser von 0,7 cm und einer Gelbettlänge von 5 bis 9 cm wurden zwischen 50 und 300 µg Protein/Gel aufgetrennt. Durch die geringe Wanderungsgeschwindigkeit der Proben im hochprozentigen Gel mußte die Laufzeit auf 5 bis 6 h ausgedehnt werden; der Elektrodenpuffer wurde zum Gebrauch nur 1 : 5 verdünnt und nach jedem Lauf erneuert, um die Stromstärke von 3 mA/Gel konstant zu halten, ohne die Spannung über 250 V anwachsen zu lassen. Um Luftblasenbildung im polymerisierenden Gel vorzubeugen, wurden sämtliche Komponenten des Gelsystems vor dem Zusammenschütten entgast. Proteinproben von 50 bis 200 µl Volumen in 1 M Saccharose wurden durch vorsichtiges Unterschichten des Elektrodenpuffers aufgetragen; Bromphenolblau in der Probe diente zur Markierung der am schnellsten wandernden Proteinbande.

2.10. Enzymelution aus Polyacrylamid-Gelen

Nach der Diskelektrophorese wurde je ein Gel enzym-spezifisch (s. 2.5.4.) und auf Protein angefärbt. Die übrigen zehn Gele wurden bei 0°C gelagert, um eine Diffusion der Banden zu vermeiden. Nach Differenzierung des Referenzgels wurden die Scheibchen mit L-AOD-Aktivität aus den Gelen herausgeschnitten, entsprechende Gelscheibchen vereinigt und mit 66,7 mM Tris-HCl pH 8 (37°C) eluiert. Der Überstand wurde im Standardansatz auf Aktivität überprüft.

2.11. Isolierung des Coenzyms

Zur Isolierung der Flavine nach RAO et al. (1967) wurde das nach 2.10. eluierte Enzym bei 0°C auf 10% Perchlorsäurekonzentration gebracht, 10 min stehengelassen und dann mit 6 N KOH auf pH 7,0 eingestellt; vom ausgefällten Perchlorat wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde gefriergetrocknet, im kleinsten Volumen dest. Wasser gelöst und im enzymatischen Test mit D-Aminosäure-Apo-oxidase auf FAD geprüft.

2.12. Enzymatischer Test auf Flavin-adenin-dinucleotid

Die Apo-oxidase wurde aus käuflicher D-Aminosäure-Oxidase aus Schweinenieren nach MASSEY und CURTIS (1966) hergestellt (s. 2.13.). Nach HUENNEKENS und FELTON (1957) wurde die Reaktivierung der D-Aminosäure-Oxidase mit FAD im gekoppelten optischen Test gemessen: 18 U LDH (Boehringer); 7,8 U Katalase; 0,25 mM NADH-natriumsalz; 50 mM NaP₂O₇ pH 8,3; 0,1 - 1,5 nMole FAD bzw. 10 - 200 µl eluiertes Enzym der Diskelektrophorese; der Start erfolgte nach 15 min bei 25°C mit 18 mM D-Alanin; Gesamtvolumen 600 µl. Der Reaktionsverlauf wurde bei 366 nm und 25°C mit einem Eppendorf-

Photometer (Netheler & Hinz, Hamburg) gemessen und mit einem Philips-Kompensationsschreiber mit Linearisierungs-glied registriert. Geringe FAD-Mengen wurden mit der Endwertmethode bestimmt: Nach Incubation von bestimmter Dauer wurde mit 0,25mM NADH gestartet und die Menge des gebildeten Pyruvats bestimmt.

2.13. Dialyse gegen Kaliumbromid

Die Kaliumbromid-Methode zur Abtrennung der prosthetischen Gruppe eines Enzyms basiert auf der Beobachtung von THEORELL und NYGAARD (1954), daß die FMN-Bindung am "alten gelben Ferment" in Gegenwart von monovalenten Ionen schwächer wird. WALAAS und WALAAS (1956) beobachteten ein ähnliches Phänomen an D-Aminosäure-Oxidase, und MASSEY und CURTI (1966a) entwickelten daraus eine Methode zur Dissoziation des Coenzym der D-AOD ohne Denaturierung des Apoenzyms. Gegenüber der klassischen Methode nach WARBURG und CHRISTIAN (1938a,b) kann das Enzym zu 100 % reaktiviert werden.

Das Holoenzym wurde bei 4°C gegen 66,7 mM Tris-HCl/ 1 mM EDTA/1 M Kaliumbromid pH 8,0 (37°C) dialysiert. Innerhalb von 36 h wurde das Dialysiermedium 4 bis 5mal gewechselt, danach wurde weitere 36 h gegen Puffer (Tris 66,7 mM) dialysiert, um vollständige Entfernung des Kaliumbromids zu gewährleisten. Das Apoenzym wurde bei -25°C gelagert. Die Reaktivierung der AOD wurde im Standardansatz mit 10^{-4} M FAD bzw. FMN geprüft.

2.14. Dünnschichtchromatographie

Um die Flavinanaloge voneinander zu trennen, wurde Cellulose zur Dünnschicht nach STAHL (Fa. Merck) verwendet. Laufmittel war 5% Dinatriumhydrogenphosphat wie es DIMANT (1952), HUENNEKENS (1957) und

YAGI (1962) für Papierchromatographie vorschlagen. Die aufsteigende Chromatographie wurde im Dunkeln bei Zimmertemperatur durchgeführt; die Spots wurden unter UV-Licht identifiziert, mit wenig Aqua dest. extrahiert und in einer Delta I der Fa. Christ(Osterode) gefriergetrocknet.

2.15. Molekulargewichtsbestimmung

Nach HEDRICK und SMITH (1968) gibt es eine lineare Beziehung zwischen dem Molekulargewicht von Proteinen und ihrer Beweglichkeit in Polyacrylamid-Gelen unterschiedlicher Konzentration. Die Methode erlaubt eine Bestimmung des Molekulargewichts eines Proteins im Proteingemisch unter der Voraussetzung, daß ein spezifischer Nachweis für das jeweilige Protein vorhanden ist.

D-Aminosäure-Oxidase aus Schweinenieren, L-Aminosäure-Oxidase aus Crotalus adamanteus-Gift, Glucose-Oxidase aus Schimmelpilzen und Katalase dienen als Standardproteine. Die Oxidasen wurden auf dem Gel mit o-Dianisidin-HCl (s. 2.5.4.) sichtbar gemacht mit D-Alanin, L-Leucin und D-Glucose als Substrat; AOD aus Schlangenorganen wurde mit L- und D-Phenylalanin incubiert. Zur Anwendung kam für alle verschiedenen Porengrößen das anodische Puffersystem Nr.1 nach MAURER (1968); das Verhältnis N,N'-Methylenbisacrylamid zu Acrylamid wurde konstant 1 : 37,5 gehalten. Die R_m -Werte wurden an 5- 7,5- 10- und 15% Gelen bestimmt. Der R_m -Wert eines Proteins verändert sich exponentiell als eine Funktion der Gelkonzentration; in logarithmische Form gebracht und als Funktion der Gelkonzentration aufgetragen, ergibt das eine Gerade. Die lineare Beziehung zwischen diesen Steigungen und den zugehörigen Molekulargewichten ermöglicht die

Bestimmung des unbekannten Molekulargewichts der Aminosäure-Oxidasen aus Schlangenorganen.

2.16. Fehlerrechnung

Notiert wird das arithmetrische Mittel aller Meßwerte $\bar{x}$ Standardabweichung s und die Zahl n der Einzelmessungen (SACHS 1968); Einzelwerte wurden jeweils aus Doppelbestimmungen erhalten.

Zum statistischen Vergleich zweier Regressionsgeraden bei der Molekulargewichtsbestimmung kam der t-Test zur Anwendung; die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf dem 5 %-Niveau errechnet.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Stabilität und Puffersysteme

Untersucht wurden Leber, Lunge und Darm von Tropidonotus natrix sowie Leber, Lunge und Niere von Cerberus rhynchops. Frisch extrahierte Acetontrockenpulver zeigten bis zu 6 h keinen L-AOD-Aktivitätsverlust bei Aufbewahrung (4°C) und Bestimmung in 66,7 mM Tris-HCl pH 7,2 bis 8,0 oder Natriumphosphatpuffer pH 7,2 ; nach 24 h war nur noch 15 % der Anfangsaktivität vorhanden und nach 36 h nur noch ein Bruchteil. Gerietrocknung in jedem Zustand der Anreicherung wird von der L-Aminosäure-Oxidase gut vertragen. Eine längere Aufbewahrung des Enzyms erfolgte zweckmäßigerweise als 60% Ammonsulfatfällung in Tris-Puffer pH 8,0.

Änderung der Pufferionen bei gleichen Bedingungen von pH und Molarität hatte keinen Einfluß auf die Oxidationsrate gegenüber L-Phenylalanin (Tab.1).

Tab.1 Abhängigkeit der L-AOD von Anionen des Extraktionspuffers.

Puffer		Aktivität [%]	
Tris/HCl	pH 7,2 pH 8,0	100	100
NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	7,2	100	
Na ₄ P ₂ O ₇ /HCl	8,2		96
Glycin/NaOH	8,2		100

KEARNEY und SINGER (1951 a,b,c) stellten bei Agkistrodon piscivorus am gereinigten sowie am ungereinigten Enzym eine spontane Inaktivierung der L-AOD in Wasser oder in Gegenwart von polyvalenten Anionen fest; Chloridionen und andere monovalente Anionen verhindern diese Inakti-

vierung. Bei Analyse der drei großen Giftschlangenfamilien konnten sie einen Einfluß von Phosphationen feststellen, der der Zuordnung der Familien entsprach; in der Familie der Crotalidae wurde die L-AOD-Aktivität in den Giften gehemmt, Gifte der Elapidae zeigten keine Beeinflussung und Gifte der Viperidae lagen dazwischen; manche L-AOD wurde in Anwesenheit monovalenter Ionen gehemmt, eine andere zeigte in Phosphat die gleiche Aktivität wie in Tris-HCl.

In diese Ergebnisse fügen sich die Werte für L-AOD der zwei untersuchten Vertreter der Colubridae gut ein; Phosphat und andere polyvalente Anionen sind dem Tris-HCl-Puffer vollkommen gleichgestellt (Tab.1).

Ein anders Phänomen, das die Stabilität bei Dialyse betrifft, wird im Kapitel Dissoziationsverhalten (3.4.) behandelt.

3.2. Einfluß von Sauerstoff

Die Geschwindigkeit der Oxidation von L-Aminosäuren durch die L-AOD aus Schlangenorganen hängt davon ab, wieviel Vol% Sauerstoff in der Gasphase vorhanden ist; in reinem Sauerstoff ist sie 90 % größer als in Luft. Die Oxidation von D-Aminosäuren durch Cerberus rhynchops-Leber wird um 60 % gesteigert.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch an anderen Aminosäure-Oxidasen gemacht. L-AOD aus Schlangengift hat in Sauerstoffatmosphäre eine 3fach höhere Aktivität (SINGER und KEARNEY 1950b), ebenso Neurospora-L-AOD (BURTON 1951); für das Säugerenzym liegen keine Angaben vor. Für L-AOD aus Proteus vulgaris ist die Abbaurate der Aminosäuren in Luft genauso hoch wie in Sauerstoff, aber auch zwischen Methylenblau und Sauerstoff als Wasserstoffacceptor ist kein Unterschied festzustellen (STUMPF und GREEN 1944). Die D-AOD der Säugerniere er-

reicht nach MASSEY et al. (1961) und (DIXON und KLEPPE (1965b) in Sauerstoff eine Steigerung der Aktivität um das Doppelte. Die Glutamat-Oxidase des Flußkrebsses wird in reinem Sauerstoff um 20 bis 30 % gesteigert (URICH 1968), das gleiche Octopus-Enzym um 70 % (RUCCA 1958), während die D-Aspartat-Oxidase der Kaninchenniere um 50 % gehemmt wird (DIXON und KENWORTHY 1967).

Auch andere Flavinenzyme wie Glucose-Oxidase (KEILIN und HARTREE 1948) und Monoamin-Oxidase aus Vertebraten (BLASCHKO 1963) sind in 100% Sauerstoff 2,5 und 1,5fach aktiver.

Im Kapitel Kinetik (3.8.1.) wird auf den Zusammenhang zwischen Sauerstoffkonzentration und L-AOD-Aktivität in Verbindung mit einer optimalen Substratkonzentration näher eingegangen. Alle weiteren Aktivitätsmessungen wurden wegen der geringen Aktivität der L-Aminosäure-Oxidase in den Schlangenorganen mit reinem Sauerstoff als Gasphase durchgeführt.

3.3. Organverteilung

Die Aktivitätsmuster der verschiedenen Organe beider Species zeigen eine gute Übereinstimmung der L- und D-Aminosäure-Oxidasen (Tab.2 und 3). Die im Vergleich zu Cerberus rhynchops 3fach höhere L-Aktivität der Ringelnatter-Lunge sticht heraus, ist aber in dieser Höhe statistisch gesichert; in der Lunge einer einzelnen Ringelnatter wurde sogar ein Umsatz von 5,9 nMol L-Phenylalanin pro min und mg Protein (n = 4) gemessen.

Prüfung der Unterschiede zwischen den Organen im t-Test mit $P < 0,05$ ergibt für die L-AOD der Ringelnatter die Reihenfolge: Lunge > Leber, Darm > Herz, Blut, Niere; für Cerberus rhynchops die Reihenfolge: Lunge > Leber >

Darm, Herz, Blut > Niere. In den übrigen Organen der Tab.2 konnte eindeutig keine L-AOD-Aktivität mit den hier angewandten Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden. Die Lunge als Organ mit besonders guter Sauerstoffversorgung hat auch in vitro die höchste L-Aminosäure-Oxidase-Aktivität. Werden die spezifischen Aktivitäten aber auf das gesamte Organ bezogen, so ist neben dem Blut die Leber das Organ mit der größten L-AOD-Kapazität; das durchschnittliche Frischgewicht der Organe wird in Tab.5 angegeben.

Seit der Entdeckung der L-AOD in Schlangengiften durch ZELLER und MARITZ (1944) und ihrem Nachweis auch in Schlangenorganen (ZELLER 1946) findet sich bis auf einen Hinweis bei HAYES und WELLNER (1969) keine weitere Angabe über das Enzym aus den Organen der Schlangen. Das Säugerenzym der L-Form wurde nur an Leber und Niere untersucht. ZELLER und seine Mitarbeiter untersuchten Rohhomogenate von Tropidonotus natrix, sowie zwei Viperidae, Vipera berus und V. aspis. Abnehmende Aktivität der L-AOD wurde in der Reihenfolge Lunge, Leber, Niere, Erythrocyten gefunden; das Enzym hat ähnliche Eigenschaften wie das in Schlangengiften gefundene.

Nach HAYES und WELLNER (1969) enthält Crotalus adamanteus außer in Gift, Giftdrüsenhomogenat und Blut keine weitere L-AOD; nach diesen Autoren ist geringe Aktivität in anderen Organen wahrscheinlich auf den Enzymgehalt des Blutes zurückzuführen. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen für die Colubridae erscheint es notwendig, die Organe von Crotalus noch einmal zu überprüfen.

Mit histochemischen Methoden wurde von BROWN (1974) der Syntheseort der L-AOD in den sekretorischen Zellen der Giftdrüse aufgezeigt. L-AOD steht damit im Gegensatz zu Monoamin-Oxidase und Succinat-Dehydrogenase, die

Tab.2 Spezifische Aktivitäten [mU/mg Protein] der L-AOD in verschiedenen Organen; gemessen im Standardtest (2.5.1.) mit 14 mM L-Phe.

	Trop.natrix	n	Cerb.rhynchops	n
Lunge	3,94 $\pm$ 0,60	8	1,32 $\pm$ 0,10	4
Leber	1,02 $\pm$ 0,14	16	1,22 $\pm$ 0,12	6
Niere	0,84 $\pm$ 0,12	4	0,55 $\pm$ 0,06	3
Blut	0,66 $\pm$ 0,05	3	1,15 $\pm$ 0,18	6
Darm	1,10 $\pm$ 0,12	4	1,00 $\pm$ 0,08	3
Herz	0,89 $\pm$ 0,04	3	1,04 $\pm$ 0,12	4
Pankreas/Milz	0,42 $\pm$ 0,30	4	0	4
Eier	0	2	0	2
Hoden	0	2	0	2
Fettkörper	-		0	2

Tab.3 Spezifische Aktivitäten [mU/mg Protein] der D-AOD in verschiedenen Organen; gemessen im Standardtest (2.5.1.) mit 14 mM D-Phe.

	Trop.natrix	n	Cerb.rhynchops	n
Lunge	0	6	0	7
Leber	8,10 $\pm$ 0,65	6	11,90 $\pm$ 0,50	5
Niere	7,85 $\pm$ 0,60	5	9,65 $\pm$ 0,30	5
Blut	0	4	0	5
Darm	5,40 $\pm$ 0,35	6	4,55 $\pm$ 0,34	6
Herz	0	3	0	5
Pankreas/Milz	0	4	0	4
Eier	0	2	0	2
Hoden	0	2	0	2
Fettkörper	-		0	2

ebenfalls in den sekretorischen Zellen der Giftdrüse vorhanden sind, in keinem Fall aber im Gift nach zu weisen sind.

Wegen der großen physiologischen Bedeutung der Gifte im Zusammenhang mit Schlangenbissen sind Enzymuntersuchungen der Organe in den Hintergrund gedrängt worden. In einer der wenigen Arbeiten über Reptilien wurden Aktivitäten von Xanthin- und Aldehyd-Oxidase an Schlangenorganen bestimmt (KHENITZKY et al. 1974). Die Werte beider Enzyme in wässrigen Homogenaten von Leber, Niere und Enddarm von Natrix erythrogaster, Ancistrodon contortrix und Thamnophis ordinatus liegen in der gleichen Größenordnung wie die Werte für L-Aminosäure-Oxidase in dieser Arbeit unter Berücksichtigung der 4-5fachen Anreicherung der L-AOD durch die Acetonfällung. Tab.4 ermöglicht die Umrechnung auf Frischgewicht.

Die ebenfalls sehr unspezifische D-Aminosäure-Oxidase der Säugerniere und-leber konnte auch in Schlangenorganen nachgewiesen werden (Tab.3). Neben Leber und Niere enthält nur noch der Darm D-AOD-Aktivität, die bis 10fach höher als die der L-AOD sein kann. Zum besseren Vergleich beider Aktivitäten wurde für D-AOD der für L-AOD optimale Ansatz von pH 8,0 und 14 mM Aminosäure benutzt. Im Sinne der Organverteilung scheint die D-Aminosäure-Oxidase wesentlich spezifischer zu sein.

Weitergehende Untersuchungen von YUSKO und NEIMS (1973) am Säugerhirn zeigen die uniforme Verteilung der D-Aspartat-Oxidase, während D-AOD nur im Cerebellum in größerer Aktivität zu finden ist. Die Beschränkung der D-AOD auf das Kleinhirn ist erst im Laufe der Evolution entstanden; bei den niederen Vertebraten, Elasmobranchier und Vögel, ist D-AOD noch gleich-

Tab. 4 Zur Umrechnung der spezifischen Enzymaktivitäten
von Basis Protein auf Basis Frischgewicht; Protein-
gehalt der verwendeten Acetontrockenpulver
[mg Protein/g Frischgewicht].

Organ	Trop.natrix	Cerb.rhynchops
Lunge	7	8
Leber	30 (120)*	43
Niere	21 (80)	18
Blut	15	5
Darm	10 (52)	10
Herz	14	16
Pankreas-Milz	7	4
Eier	25	31
Hoden	7	8
Fettkörper	-	3

*) zum Vergleich wässrige Organhomogenate von Natrix erythrogaster (KRENITSKY 1974).

Tab. 5 Durchschnittliches Frischgewicht der Organe [g].

Organ	Trop.natrix	Cerb.rhynchops
Lunge	1,0	1,2
Leber	4,2	3,7
Niere	1,2	1,2
Blut (z.T.)	1,1	1,2
Darm (z.T.)	4,9	1,7
Herz	0,12	0,35
Pankreas-Milz	0,59	0,27
Eier/Tier	8,9	10,2
Hoden	0,84	0,72
Fettkörper (z.T.)	-	2,0

mäßig auf alle Hirnteile verteilt, bei Rind, Schaf, Maus und Ratte ist die D-AOD überwiegend im Cerebellum lokalisiert (GOLDSTEIN 1966).

Werden die spezifischen Aktivitäten der L-AOD mit Rohgiften und Säuger-L-Enzym verglichen, fällt die geringe Aktivität der Schlangenorgane und der Rattenniere im Gegensatz zur hohen Aktivität der Gifte auf; das Crotalus adamanteus-Gift hat unter den hier gebrauchten Messbedingungen einen Umsatz von 3,0 μMol L-Leucin/min mg Protein, entsprechend einem Q_{O_2} von 2 000 [$\mu\text{O}_2 = \mu\text{l O}_2/\text{h mg Protein}$], bei SINGER und KEARNEY (1950b) $Q_{O_2} = 743$ für Agkistrodon piscivorus und ZELLER (1948) $Q_{O_2} = 50$ bis 250 für verschiedene Giftschlangen, während die L-AOD aus Trockenpulver der Rattenniere 0,5 bis 1,0 nMol L-Leucin/min mg Protein umsetzt; die L-AOD nach NAKANO und DANOWSKI (1966, 1967) verbraucht zum Vergleich im Rohhomogenat 0,5 nMol L-Leucin (Mitochondrien) und 1,2 nMol L-Leucin/min mg Protein im löslichen Überstand.

Die in Schlangenorganen gefundene D-Aminosäure-Oxidase liegt mit ihren Aktivitäten in der Größenordnung zwischen der D-AOD aus Rana temporaria-Niere (BALINSKY und BALDWIN 1962) und der D-AOD aus R. pipiens-Gehirn (GOLDSTEIN 1966); die von CORRIGAN et al. (1963) in Insektenorganen gemessenen Aktivitäten erreichen nur im Fettkörper die Höhe der D-AOD aus Schlangenorganen; die Organverteilung der D-AOD ist aber größer. Funde von D-Aminosäuren in der Hämolymphe von Insekten (SRINIVASAN et al. 1962), sowie die Fähigkeit, D-Aminosäuren aktiv mit einer Diät aufzunehmen (FRAENKEL und PRINTY 1954; ROCK et al. 1975) deuten an, daß D-Aminosäuren im Stoffwechsel der Insekten eine gewisse Bedeutung haben können, während D-AOD bei Wirbeltieren höchstens eine Entgiftungsfunktion erfüllen könnte.

3.4. Dissoziationsverhalten

Die Herstellung des aktiven Apoproteins der L-AOD aus Schlangengorganen durch Dialyse gegen Kaliumbromid blieb in jedem Fall erfolglos. Die spezifischen Aktivitäten gemessen im Standardansatz mit und ohne Flavine (FAD oder FMN) waren innerhalb der Fehlergrenze der Methode nicht voneinander zu unterscheiden.

Der Vergleich mit dem "Holoenzym" vor der Dialyse zeigte eine Aktivitätszunahme der L-AOD (Lunge) um 100 %, der L-AOD (Leber) sogar um das 2-fache der Anfangsaktivität. Dabei blieben Zusätze von Kaliumbromid bis zu 100 mM im Standardansatz ohne Einfluß. Enzymproben, die während des gleichen Zeitraumes nur gegen 66,7 mM Tris-HCl/1mM EDTA pH 8,0 dialysiert wurden (s. 3.1. Stabilität), hatten ihre Aktivität verloren. L-AOD aus Crotalus-Gift zeigte ein ähnliches Verhalten; nach 3 Tagen gingen bei gleicher Behandlung 95 % der Aktivität verloren, nach Dialyse gegen Kaliumbromid blieb die Aktivität erhalten.

Aufgrund dieser Verhaltensweise lassen sich zwei Hypothesen aufstellen. 1. Die L-Aminosäure-Oxidase wird durch einen bis jetzt unbekannten Stoff gehemmt, der mit dem Enzymprotein so fest verbunden ist, daß eine hohe KBr-Konzentration notwendig ist, um eine Dissoziation zu erreichen.

2. Die L-AOD liegt in teilweise inaktiver Form vor, z.B. durch die abrupte Acetonfällung. Die Reaktivierung ist ein zeitabhängiger Vorgang unter Zuhilfenahme von bestimmten Anionen.

Über eine reversible Inaktivierung der L-Aminosäure-Oxidase aus Schlangengiften haben bereits mehrere Autoren berichtet (SINGER und KEARNEY 1950a; KEARNEY und SINGER 1951a,b ; WELLNER 1966; CURTI et al. 1968);

da sich weder bei der temperaturabhängigen Inaktivierung noch bei der Inaktivierung durch Einfrieren physico-chemische Eigenschaften des Enzyms ändern, deuten sie die Möglichkeit an, daß diese Inaktivierung assoziiert ist nur mit einer lokalen Konformationsänderung des aktiven Zentrums. Auch die L-AOD der Schlangenorgane hat vor und nach Dialyse gegen KBr die gleichen elektro-phoretischen Beweglichkeiten (s. 3.5.).

Im Dissoziationsverhalten ist zwischen der Schlangenorgan- bzw. Gift-L-AOD und dem ebenfalls L-spezifischen Säugerenzym kein Unterschied zu bemerken; L-AOD aus Rattenniere ist stabil gegenüber KBr, das Coenzym ist so fest gebunden, daß alle Bemühungen, ein aktives Apoenzym zu erhalten, bis jetzt fehlschlagen (CROMARTIE und WALSH 1975).

Ganz anders ist dagegen das Verhalten der D-spezifischen Oxidase der Schlangenorgane: Die Dialyse gegen KBr vermindert die Aktivität der Leber- und Nierenhomogenate von Tropidonotus natrix und Cerberus rhynchops auf ein Viertel; durch Zugabe von FAD wird die Ausgangsaktivität zu 95 % wiederhergestellt; FMN ist wirkungslos und entspricht dem Wert ohne Flavin. Damit ist wahrscheinlich gemacht, daß FAD das natürliche Coenzym der D-AOD aus Schlangenorganen ist.

L-AOD aus Schlangenorganen unterscheidet sich also durch die feste Bindung Coenzym-Enzymprotein von der an gleicher Stelle vorhandenen D-AOD.

Die prosthetische Gruppe des Säuger-D-Enzyms geht schon während des Reinigungsganges verloren (NEGELEIN und BRÖMEL 1939; MASSEY et al. 1961; YAGI et al. 1967) und muß im Testansatz zugesetzt werden. Die D-Aminosäure-Apooxidase der Schlangenorgane entspricht dagegen mehr der D-Glutamat-Oxidase aus dem Flußkrebs (URICH 1968),

die innerhalb der Gruppe der D-Amino-dicarbonsäure-Oxidasen ein ähnliches Verhalten gegenüber Kaliumbromid zeigt; nach Dialyse sind etwa 33 % Coenzym abgespalten, mit FAD kann die Aktivität bis zu 90 % wiederhergestellt werden, während FMN wirkungslos bleibt. Die D-Aspartat-Oxidase aus Hepatopancreas von Octopus kann noch schwerer in Apoenzym und Coenzym gespalten werden; das Apoenzym ist sehr instabil und mit FAD kann nur ein geringer Prozentsatz der Ausgangsaktivität zurückgehalten werden (D'AMIELLO und ROCCA 1972). Die D-Amino-dicarbonsäure-Oxidase der Säugeriere (DIXON und KENWORTHY 1967; JAROSZEWICZ 1975) verliert wie die D-Amino-monocarbonsäure-Oxidase gleicher Herkunft den größten Teil des Coenzyms während der Reinigung und kann erst durch Zusatz von FAD überhaupt gemessen werden. Die zu 85 % mit FMN reaktivierbare Lactat-Oxidase aus Mycobacterium kann auch mit Riboflavin incubiert werden und erreicht 24 % der mit FMN beobachteten Aktivität (CHOONG et al. 1975).

3.5. Elektrophoretische Eigenschaften

Elektropherogramme von Acetontrockenpulverextrakten der Leber (20 000g-Überstand=Reinigungsstufe I) beider Species zeigen nach L-AOD-spezifischer Anfärbung eine einzige Bande mit gleicher relativer Wanderungsgeschwindigkeit (R_m) im 7,5% Gel. Die Leber einer einzelnen Schlange ergibt auch nur eine L-AOD-Bande, die Elektropherogramme der übrigen untersuchten Organe (Lunge, Niere, Darm, Herz und Blut) sind ebenfalls identisch (Abb.1h). Mischelektrophoresen von Leber- und Darmextrakt der Acetontrockenpulver von Tropidonotus natrix brachten die Enzymbanden zur Deckung (Abb.4). In Ansätzen mit D-Phenylalanin oder D-Prolin mit FAD-Zusatz ist die D-Aminosäure-Oxidase ebenfalls nur als einbandig nachzuweisen (Abb.1i). Die Verteilung des Enzyms in den Organen entspricht den durch

kinetische und quantitative Meßungen am Acetontrockenpulver genauer bestimmten Werten (vergl. 3.3.). L- und D-Aminosäure-Oxidase haben im 7,5% Gel den gleichen R_m -Wert; dieses Ergebnis ist nicht zu erwarten gewesen. Ansätze ohne Substrat verliefen negativ, so daß Artefakte auszuschließen sind. Eine Verunreinigung der Substrate mit den jeweiligen optischen Isomeren wurde für D-Leucin festgestellt, durch Incubation mit L-Aminosäure-Oxidase (Gift) wurde der Anteil L-Leucin aber vollständig oxidiert und eliminiert. D-Aminosäure-Oxidase mit einer um mehr als 8fach höheren Aktivität gegenüber L-Aminosäure-Oxidase wurde unter den gleichen Bedingungen untersucht wie das L-Enzym der Schlangengorgane, pH 8,0 und 5 mM D-Aminosäure; dies entspricht damit keinem optimalen Test für dieses Enzym. Wie sich zeigte, ist D-Prolin ein gutes Substrat auch für das Enzym aus Schlangengorganen, in der L-Konfiguration wird es aber von der L-AOD nicht oxidiert.

Bereits 1945 war das für ZELLER und MARITZ ein wichtiges Merkmal, um die Säuger-L-AOD vom Schlangengift-enzym zu unterscheiden. Gefriertrocknung der Extrakte sowie Vorbehandlung der Gele zur Entfernung des Persulfat-Katalysators blieben ohne Einfluß auf die Aminosäure-Oxidasen und ihre Pherogramme.

Die elektrophoretische Einheitlichkeit der L- und D-Aminosäure-Oxidase aus Schlangengorganen ist damit bewiesen; das Fehlen von Isoenzymen ist sehr wahrscheinlich geworden.

Um diese Ergebnisse nicht nur mit Literaturwerten vergleichen zu können, sondern auch gleichzeitig einen kontrollierbaren Vergleich der Arbeitsmethoden zu haben, wurden L-AOD aus Crotalus adamanteus-Gift und D-AOD aus Schweinenieren ebenfalls analysiert. Hier sind D- und L-Aktivitätsbanden deutlich voneinander

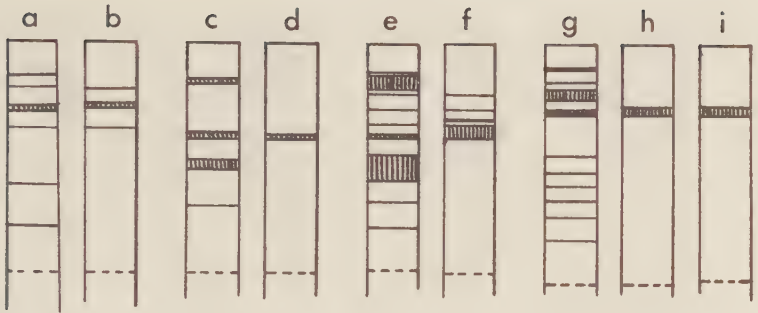


Abb.1 R_m -Werte der Aminosäure-Oxidasen bei Änderung des "running-pH"; 7,5% Gel, Trennung pH 9, Protein- und AOD-spezifische Anfärbung alternierend. a,b L-AOD (Crotalus adamanteus-Gift); c,d D-AOD (Schweinenieren); e,f beide zusammen; g,h,i L- und D-AOD (Trop.natrix-Leber).

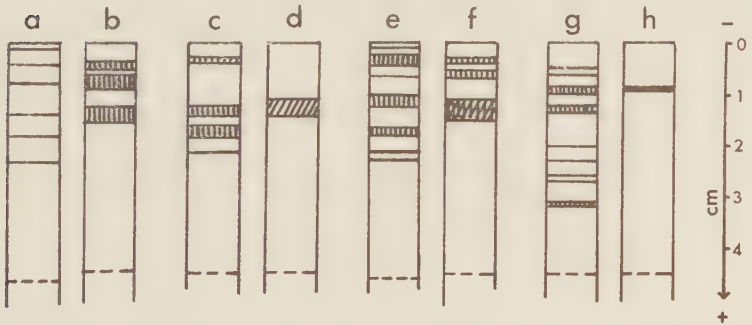


Abb.2 R_m -Werte der Aminosäure-Oxidasen bei Änderung des "running-pH"; 7,5% Gel, Trennung pH 8, Protein- und AOD-spezifische Anfärbung alternierend. a,b L-AOD (Crotalus adamanteus-Gift); c,d D-AOD (Schweinenieren); e,f beide zusammen; g,h, L- und D-AOD (Trop.natrix-Leber).

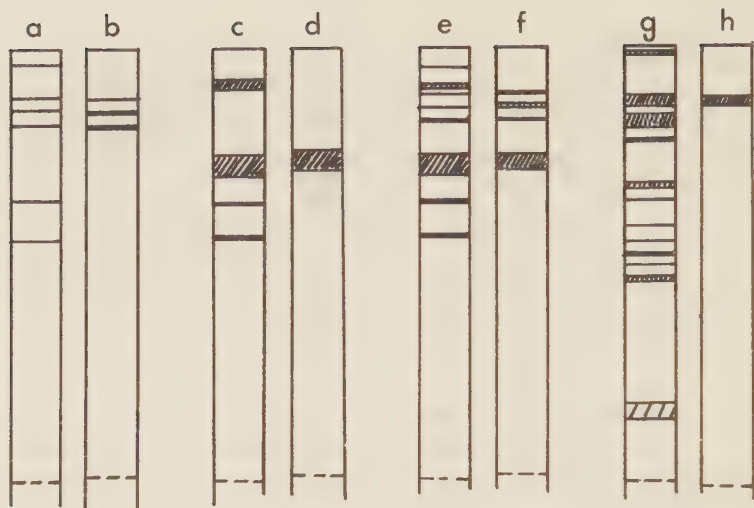


Abb. 3 R_m -Werte der Aminosäure-Oxidasen bei Änderung der Porengröße; 17% Gel, Trennung pH 9, Protein- und AOD-spezifische Anfärbung alternierend. a, b L-AOD (Crotalus adamanteus-Gift); c, d D-AOD (Schweinenieren); e, f beide zusammen; g, h L- und D-AOD (Cerp. rhynchops-Leber).

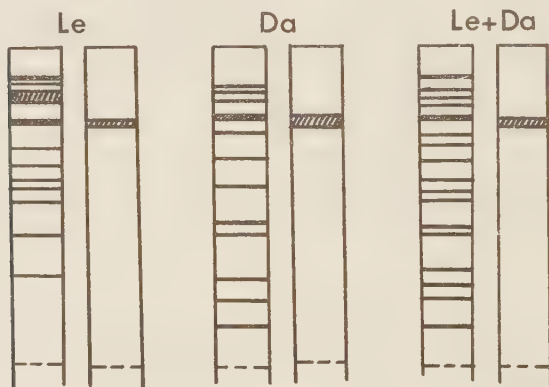


Abb. 4 Mischelektrophorese der AOD aus Schlangenorganen; 7,5% Gel, Trennung pH 9, Protein- und enzymspezifische Anfärbung alternierend: ca. 120 μ g Protein/Gel. Trop. natix-Le.

getrennt (Abb. 1b, d und f). Das Schlangengift wird in diesem Gelsystem in 6 bis 7 anodisch wandernde Proteine aufgetrennt, von denen drei Banden mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten durch o-Dianisidin als L-Aminosäure-Oxidase identifiziert werden können, Elapiden-Gift hat 6 anodisch und 6 kathodisch wandernde Proteinkomponenten (CHATMAN und DI MARI 1974).

WELLNER und MEISTER (1960) isolierten diese Isoenzyme der L-AOD aus Crotalus adamanteus-Gift. L-AOD aus dem Gift einer einzelnen Schlange zeigte nur zwei Enzymbanden, die Bande mit der geringsten negativen Nettoladung fehlte. HAYES und WELLNER (1969) untersuchten Gift von mehreren einzelnen C. adamanteus sowie Blut und Homogenat der Giftdrüse durch Elektrophorese an Polyacrylamid-Gelen; sie fanden im unbehandelten Gift zweimal Isoenzym A, zweimal C und zweimal A,B,C. Blut und Giftdrüse zeigten eine einheitliche L-AOD-Bande vom Typ A, allerdings enthielt das entsprechende Gift auch nur Isoenzym A, so daß die Frage offenbleiben muß, ob sich Pherogramme von Gift und Organen im Isoenzymmuster unterscheiden oder entsprechen. Mit Hilfe der Gelelektroisocrossung konnte man die Heterogenität dieser Isoenzyme ermitteln; im pH-Gradienten spalteten sich die einzelnen Isoenzyme in 5 bis 7 weitere Komponenten mit isoelektrischem Punkt im Bereich von 5,20 bis 8,40 auf. Die zum Vergleich mituntersuchte D-AOD, gereinigt aus Schweinenieren, zeigte nur zwei Komponenten, Holo- und Apoenzym. HAYES und WELLNER führen den Gehalt an L-Aminosäure-Oxidase in Organen ausschließlich auf den Gehalt des Blutes zurück, eine Vermutung, die durch die spezifischen Aktivitäten der Organe der beiden Colubridae widerlegt wird (vergl. 3.3, Tab.2). Isoenzyme sind offensichtlich ganz unterschiedlich bei den einzelnen Schlangen der Species Crotalus

adamanteus vorhanden.

Dreibandigkeit wurde auch für die L-AOD aus Vipera palestinae auf der Diskelektrophorese gefunden (SHAHAM und BDOIAH 1973)); schon 1960 hatten KOCHWA et al. bei der Auftrennung dieses Giftes im linearen Ionenstärkegradienten an DEAE-Cellulose zwei Peaks als L-AOD identifizieren können. Keine Isoenzyme konnten nachgewiesen werden für Agkistrodon piscivorus (SINGER und KEARNEY 1950; WELLMER und MEISTER 1960) und V. ammodytes (ZWISLER 1965; KURTH und AURICH 1973).

Im Gelsystem Nr.1 nach MAURER entspricht der R_m -Wert von 0,25 für V. ammodytes (KURTH und AURICH 1973) sehr gut dem hier für L-AOD aus Organen ermittelten Wert von 0,27. C. adamanteus-Isoenzyme haben relative Beweglichkeiten von 0,20 0,30 und 0,40 in guter Übereinstimmung mit CURTI und MASSEY (1968).

MASSEY und RAO (1961, 1963) trennten Gifte von Vertretern verschiedener Familien mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese. Echis carinatus und V. russellii (Viperidae) sowie Naja naja und Bungarus caeruleus (Elapidae) haben je eine anodisch wandernde L-AOD; bei V. russellii und B. caeruleus kommt noch eine Bande mit jeweils unterschiedlicher positiver Ladung hinzu. Die anodisch wandernden Komponenten aus V. russellii-Gift und die aus Gift der Kobra scheinen sich in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit zu entsprechen. L-AOD aus B. caeruleus ist weniger, aus Echis carinatus stärker negativ geladen.

Die L-Aminosäure-Oxidase der Säugerniere und -leber gibt es in der löslichen und mitochondrialen Fraktion mit den gleichen physico-chemischen und immunologischen Kennzeichen (NAKANO und DANOWSKI 1966, 1967). Diese Übereinstimmung wurde von DOMENECH et al. (1973) angezweifelt; sie fanden zwei "ladungsisomere" Enzymformen

gleichen Molekulargewichts, so daß die Möglichkeit von Polymeren verschiedenen Grades, aber der gleichen Polypeptideinheit auszuschließen war. Neueste Untersuchungen von CROMARTIE und WALSH (1975) bestätigen das Vorkommen von Isoenzymen auch bei der L-AOD der Sauer; die lösliche Fraktion hat aber drei Isoenzyme, die Mitochondrienfraktion hat nur eine Enzymform. Es handelt sich um Formen mit gleichen elektrophoretischen Beweglichkeiten sowohl in Mitochondrien als auch in der löslichen Fraktion und um Isoenzyme mit gleichem Molekulargewicht, um Laungsisomere in der Definition nach HEDRICK und SMITH (1968). Die Unterscheidung und Trennung dieser beiden Fraktionen beruht mehr auf einer technischen als auf einer physiologischen Einteilung.

So weit sich die vorliegende Literatur überblicken läßt, liegt für die D-Aminosäure-Oxidase der Sauer weder Makro- noch Mikroheterogenität vor (HAYES und WELLNER 1969) in Übereinstimmung mit den Abb.1 - 3 und den Ergebnissen von TU et al. (1973a,b), multiple Formen der D-Aspartat-Oxidase von Octopus werden ebenfalls verneint (D'ANIELLO und ROCCA 1972).

Solange die Versuchsbedingungen konstant gehalten werden, ist Überlappen von Proteinen in einem großen Proteingemisch nicht bemerkenswert. Andererseits kann dann aber eine einzige Bande auf der Diskelektrophorese nicht in jedem Fall als unwiderruflich homogenes Protein gedeutet werden. Bei der Wahl der Porengröße des Gels, dem Verhältnis Monomer zu Co-monomer und dem pH des Konzentrierungs- und Trennungsvorganges kann gerade der Punkt der geringsten Auflösung zweier Proteine getroffen sein. Aus Abb.2 sind die Wanderungsgeschwindigkeiten der Oxdasen bei verändertem "running-pH", d.h. Gelsystem Nr.6 nach MAURER, Trennung bei pH 8,0 , zu entnehmen.

Der 20 000 g Überstand (Reinigungsstufe I) aus Leber von Tropidonotus natrix und Cerberus rhynchops zeigte auch unter diesen veränderten Bedingungen keine bessere Auflösung der L- und D-Bande. Für Crotalus adamanteus-Gift und D-AOD (Schweinenieren) wird das Auflösungsvermögen schlechter; die am raschesten wandernde A-Komponente des Schlangenenzyms kommt mit der D-AOD zur Deckung (Abb.2f); Ladungs- und Größenunterschiede beider Proteine heben sich gerade auf. Elektrophorese mit einem Trennvorgang bei pH 9 ist optimaler für Auflösung und Wanderungsgeschwindigkeit beider Aminosäure-Oxidasen.

Änderung des Vernetzerverhältnisses auf 1 : 150 und gleichzeitige Steigerung der Acrylamidmenge auf 17 % und 30 % entsprechend dem Gelsystem Nr.2 und Nr.3 nach MAURER hatte eine allgemeine Verzögerung der Proteinbanden zur Folge (Abb.3 und Tab.6). Durch Reduzierung des Vernetzers wurden D-AOD aus Schweinenieren und L-AOD aus C. adamanteus weit besser als beim Verhältnis 1 : 37,5 getrennt; der Siebeffekt der Gele steigerte sich mit höherer Acrylamidkonzentration, so daß die Verzögerung der Oxidasen im Gelsystem ohne Bedeutung war. L- und D-Aminosäure-Oxidase aus den Schlangenorganen blieben aber weiter mit gemeinsamer relativer Beweglichkeit im Bereich der mittleren Crotalus-Bande liegen (Tab.6).

Verschiedene Autoren, u.a. DAVIS (1964) und ORNSTEIN (1964), vertreten die Auffassung, der Vernetzer hätte keinen Einfluß auf die Porengröße, er würde dem Gel nur mechanische Festigkeit verleihen. Nach DAVIS sollte mit steigender Acrylamidkonzentration weniger Comonomer genommen werden, um die Elastizität der Gele zu erhalten. Tatsächlich läßt sich das 30% Gel mit 1 : 150 Bis/Acrylamid besser handhaben als ein 15%

Tab.6 R_m -Werte von L-AOD (C.adamanteus-Gift), D-AOD (Schweinenieren), L- und D-AOD (Trop.natrix-Leber) in Gelen mit verschiedener Acrylamidkonzentration und verschiedenem Bis/Acrylamidverhältnis; 5- 7,5 % 1:37,5; 17- 30 % 1:150.

	5 %	7,5 %	17 %	30 %
L-AOD (Gift)	0,25 0,35 0,46	0,20 0,29 0,40	0,11 0,12 0,16	0,01 0,04 0,07
D-AOD (Schwein)	0,48	0,42	0,29	0,21
L-,D-AOD (Organe)	0,37	0,27	0,14	0,03

Tab.7 R_m -Werte von L-AOD (C.adamanteus-Gift), D-AOD (Schweinenieren), L- und D-AOD (Cerb.rhynchops-Leber) in Gelen mit verschiedener Acrylamidkonzentration und gleichem Bis/Acrylamidverhältnis (1:37,5).

	5 %	6 %	7,5 %	10 %	15 %
L-AOD (Gift)	0,27 0,34 0,46	0,25 0,32 0,44	0,20 0,30 0,40	0,15 0,19 0,28	0,08 0,10 0,13
D-AOD (Schwein)	0,52	0,45	0,41	0,35	0,18
L-,D-AOD (Organe)	0,38	0,30	0,27	0,18	0,10
GOD	0,25 0,36 0,95	0,18 0,25 0,68	0,14 0,21 0,44	0,08 0,12 0,25	0,04 0,05 0,08
Katalase	0,70	0,45	0,31	0,13	0,04

mit 1 : 37,5 , wie es bei der Molekulargewichtsbestimmung zur Anwendung kam. Andere Untersucher konnten eine merkliche Abhängigkeit der Porengröße vom Vernetzer feststellen, u.a. ZWISLER und BIEL (1966), HEDRICK und SMITH (1968) sowie WEBER und OSBORN (1969). Ein Vergleich der Pherogramme von Aminosäure-Oxidasen in Gelsystemen mit unterschiedlicher Vernetzermenge, das 17% Gel aus Tab.6 und das 15% Gel aus Tab.7, bestätigt den Einfluß des Vernetzers.

Die Änderung aller möglichen Parameter bleib also ohne Einfluß auf die Trennung von L- und D-Aminosäure-Oxidase aus Schlangenorganen. Da die elektrophoretische Beweglichkeit eines Proteins im Puffersystem durch die Nettoladung des ganzen Moleküls zustande kommt, könnte man zwischen L- und D-Enzym Unterschiede vermuten, die sich in der Summe aufheben und durch diese Methode nicht sichtbar gemacht werden können. Über die beiden Enzyme der Schlangenorgane kann aber folgendes gesagt werden: während das L-Enzym in seinen elektrophoretischen Eigenschaften dem Crotalus-Isoenzym B entspricht, aber nur einbandig ist, unterscheidet sich das D-Enzym stark von dem Säuger-D-Enzym. (Tab.8).

Tab.8 Abhängigkeit der R_m -Werte vom Bis/Acrylamidverhältnis.

Bis/Acrylamid	D-AOD (Schweineniere)	D-AOD (C. rhynchops)
1 : 37,5 (15%)	0,18	0,10
1 : 150 (17%)	0,27	0,15

3.6. Molekulargewichtsbestimmung

Tab.7 gibt die K_m -Werte der Standard- und Testproteine bei verschiedenen Gelkonzentrationen und gleichem Bis/Acrylamidverhältnis wieder. Da die relativen Beweglichkeiten sich exponentiell als Funktion der Gelkonzentration ändern, ergibt $\log K_m$ gegen die Gelkonzentration aufgetragen eine Gerade. Die Regressionsgeraden, ermittelt bei fünf verschiedenen Konzentrationen mit drei bis fünf Einzelmessungen, sind für die Aminosäure-Oxidasen in Abb.5 zusammengefaßt worden; auf die Regressionsgeraden der übrigen Eichproteine wurde in der Darstellung verzichtet, um das Diagramm nicht unübersichtlich zu machen. Alle errechneten Steigungen sind neben den Molekulargewichten in Tab.9 aufgeführt.

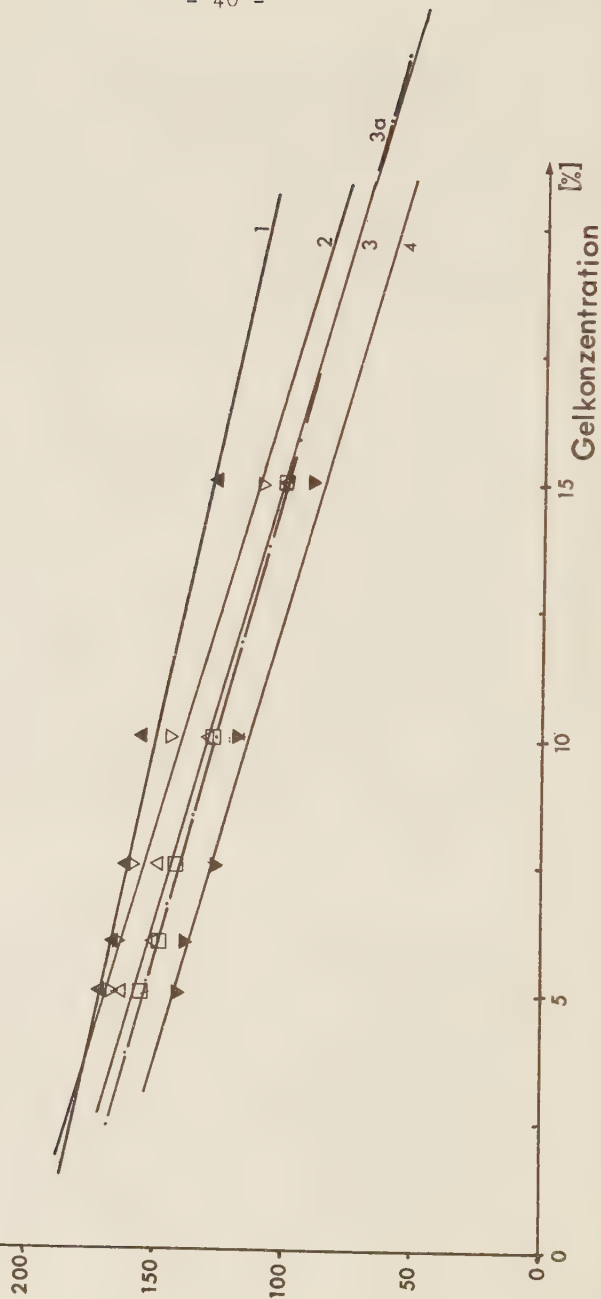
Die Regressionsgerade von L-AOD (2) schneidet diejenige der D-AOD nicht bei 0 %-Gelkonzentration; beide Geraden haben nur geringe Steigungen im Vergleich zu Katalase oder Glucose-Oxidase; L- und D-AOD werden entsprechend ihrem kleineren Molekulargewicht weniger gesiebt. Die Schnittpunkte mit der Ordinate, die höher für die L-AOD liegen, zeigen die negative Ladung an. Beide Aminosäure-Oxidasen unterscheiden sich in Größe und Ladung.

Die drei Isoenzyme der L-AOD ergeben parallele Geraden; sie haben das gleiche Molekulargewicht, aber unterschiedliche Ladung, betrachtet man die Ordinaten-schnittpunkte. Wie die LDH-Isoenzyme gehören sie zu den ladungsisomeren Proteinen in der Definition nach MARKERT und MÖLLER (1959). Die Regressionsgerade für L- und D-AOD aus Tropidonotus natrix-Leber ist kaum von der mittleren L-AOD (3) zu unterscheiden. Rechnerisch wurde eine Steigung ermittelt, die der der L-AOD (3) entspricht; ein signifikanter Unterschied

Abb. 5

Exponentieller Zusammenhang zwischen Gelkonzentration und Wanderungsgeschwindigkeit. (Legende entspricht Tab.9)

$100 \log(R_m \times 100)$



Tab.9 Molekulargewichte der Standardproteine zur Molekulargewichtsbestimmung der L- und D-Aminosäure-Oxidase aus Schlangenorganen.

Nr.	Protein	Steigung (-)	MG	Literatur
1	D-Aminosäure-Oxidase (EC 1.4.3.3)	4,5	114 000	YAGI, K. (1971) TU et al. (1973) HENN und ACKERS (1969)
2	L-Aminosäure-Oxidase	5,3	130 000	WELLNER und MEISTER (1960)
3	(EC 1.4.3.2)	5,5		
4		5,9		
3a	Schlangenorgan-AOD	5,6		
5	Glucose-Oxidase	7,8	152 000	SWOBODA und MASSEY (1965)
6	(EC 1.1.3.4)	8,3	154 000	
7		10,6	186 000	KUSAI et al. (1960)
8	Katalase (EC 1.11.1.6)	13,3	240 000	SAMEJIMA und YANG (1963)

zwischen beiden konnte nicht festgestellt werden. Der Schnittpunkt mit der Ordinate liegt etwas unterhalb des Schnittpunktes der L-AOD (3), die Nettoladung scheint geringer zu sein; auch hier konnte ein signifikanter Unterschied zwischen L-AOD (3) und den Aminosäure-Oxidasen der Schlangenorgane nicht festgestellt werden.

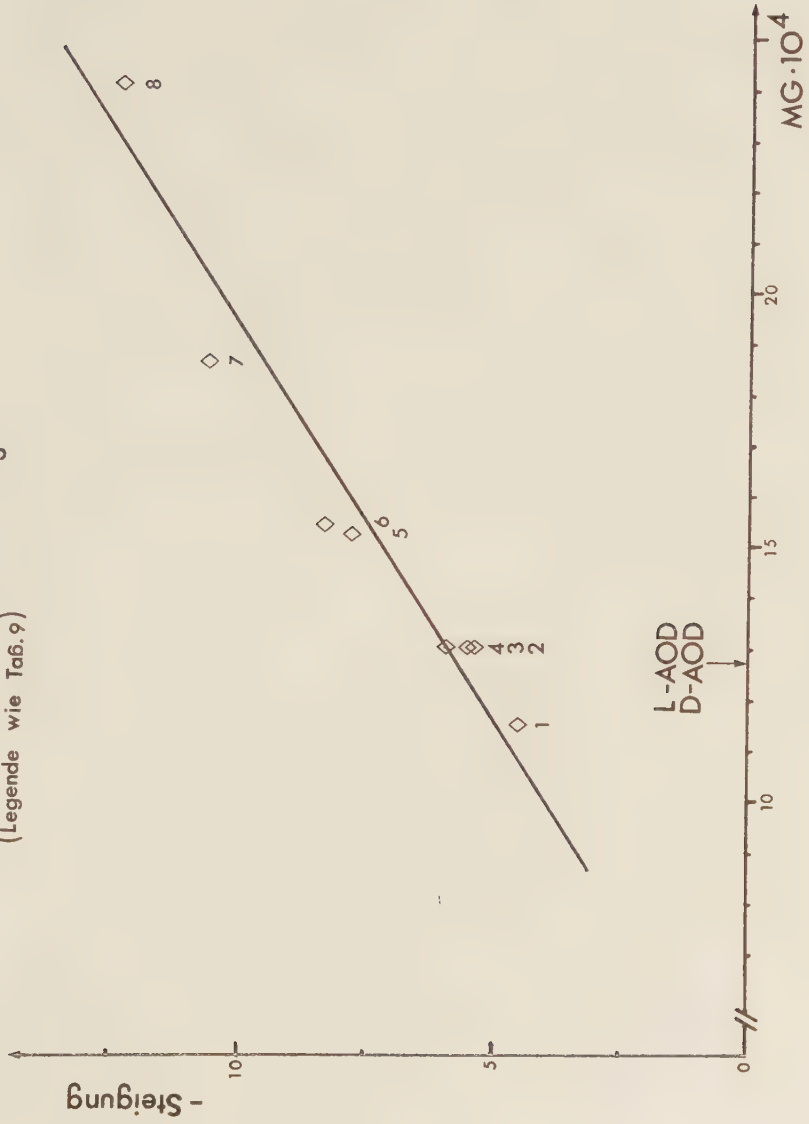
Es kann also angenommen werden, daß L- und D-Aminosäure-Oxidase aus Schlangenorganen die gleiche negative Nettoladung im anodischen Gelsystem und die gleiche Molekülgröße haben.

Für das Molekulargewicht ergibt sich ein Wert von $128\ 000 \pm 10\ 000$ (Abb.6).

Bei der vorliegenden Untersuchung durch Gelelektrophorese wurde die Molekülform nicht berücksichtigt. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß sich beide Oxidasen in der Form unterscheiden; während das eine Enzym globulär ist, könnte das andere in langgestreckter Form vorliegen. Nach HEDRICK und SMITH (1968) hat die Gestalt eines Proteins keine große Bedeutung für die Auflösung der Proteingemische an der Gelelektrophorese.

Tab.10 vergleicht die für L- und D-Aminosäure-Oxidase aus Schlangenorganen gefundenen mit den bis jetzt untersuchten Molekulargewichten von Aminosäure-Oxidasen anderer Herkunft.

Abb. 6 Molekulargewichtsbestimmung
(Legende wie Tab. 9)



Tab.10 Vergleich der Molekulargewichte von Aminosäure-Oxidaseen verschiedener Herkunft.

Species	MG	Literatur
Trop.natrix (Colubridae)	128 000	1
Cerb.rhynchops "	128 000	1
Vipera ammodytes (Viperidae)	135 000	2
V.palestinae "	130 000	3
C.adamanteus (Crotalidae)	130 000	4,5
Agkistrodon piscivorus "	130 000	4
Rattenniere	315 000*	6
Corynebacterium	130 000-140 000	7
Neurospora crassa	300 000	8
Schweineniere	114 000	9
Octopus vulgaris	100 000	10

- Literatur: 1. diese Arbeit
 2. KURTH und AURICH (1973)
 3. SHAHAM und BDCLAH (1973)
 4. WELLNER und MEISTER (1960)
 5. DE KOK und RAWITCH (1969)
 6. NAKANO et al. (1968)
 7. COUDERT und VANDECASTEELE (1975)
 8. AURICH et al. (1972)
 9. YAGI et al. (1971)
 10. D'ANIELLO und ROCCA (1972)

*) nur 200 000 nach neuester Mitteilung von CROMARTIE und WALSH (1975).

3.7. Anreicherung der L-Aminosäure-Oxidase

Vorversuche ergaben bei 55 bis 55 % Ammonsulfat-sättigung aus Acetontrockenpulverextrakten von Herz, Leber und Lunge eine befriedigende Anreicherung mit einer Ausbeute zwischen 70 und 90 %; das Lebertrockenpulver erschien wegen der Menge des zur Verfügung stehenden Materials am geeignetsten; L-AOD aus Lunge von Tropidonotus natrix hatte die größte Aktivität im Rohextrakt (Tab.2, Organverteilung) und war ohne jede D-AOD-Aktivität (Tab.3), so dass die geringe Menge angereicherter L-AOD der Lunge zur Identifizierung der prosthetischen Gruppe des L-Enzyms der Schlangengorgane herangezogen wurde. Kinetische Untersuchungen erfolgten mit dem Leberenzym.

BLANCHARD und Mitarbeiter berichteten schon 1944 und 1945 über das Nebeneinander von L- und D-AOD in Nierenhomogenaten der Ratte; einen Ausschluß des D-Enzyms erreichten sie durch Fällung mit neutralem 15% Dinatriumsulfat und Lagern bei saurem pH, eine Methode die nur für kleine Mengen angewendet werden konnte und, sicher bedingt durch den pH, zur Bildung einer ohne FAD-Zusatz inaktiven D-AOD-Apooxidase führte (Vergl. 3.8.3.). Zur Aufarbeitung größerer Mengen wurde die Acetonfällung herangezogen.

Im Reinigungsgang der L-AOD aus Schlangengiften wird von vielen Arbeitsgruppen als erster Schritt eine Hitzedenaturierung in Anwesenheit von Substrat bevorzugt (SINGER und KEARNEY 1950b; WELLNER und MEISTER 1960; ZWISLER 1965; SHAHAM und BDOLAH 1973). Diese Methode erschien für Organhomogenate ungeeignet; die geringe L-AOD-Aktivität ist in der Menge des Fremdproteins nicht wiederzufinden. Organextrakte entsprechen in ihrem Proteinspektrum viel eher Nierenhomogenaten von Säugern als spezialisiertem

Gift, in dem nach ZELLER (1948) bis zu 3 % L-AOD im Trockengewicht vorhanden sein kann; nach SHAHAM und BDOLAH (1973) wurde sogar 4 % L-AOD im Trockengift von Vipera palestinae gefunden.

Die Anreicherung der L-AOD aus Lunge und Leber wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt:

Fraktionierte Ammonsulfatfällung
Ionenaustauscher-Chromatographie
Fraktionierte Ammonsulfatfällung
(Polyacrylamidgel-Elektrophorese)

Die erste Ammonsulfatfällung zwischen 35 bis 60% Sättigung brachte eine Reinigung um den Faktor 2,5 bei 80 % Ausbeute für Leber von Tropidonotus natrix (Reinigungsstufe II), Tab.11 . Die D-Aminosäure-Oxidase wurde nicht vollständig ausgeschlossen, wurde aber auch nicht angereichert; bei mehr als 50 % Ammonsulfat-sättigung hat das Enzym eine geringere Löslichkeit. Dieser Vorteil konnte aber nicht berücksichtigt werden, da das L-Enzym zwischen 50 und 60 % Sättigung zwar 4fach angereichert wird, aber nur eine Ausbeute von weniger als 25 % bringt.

Bei der anschließenden Chromatographie an DEAE-Cellulose wurde L-AOD mit 5 mM Tris/1 mM EDTA, pH 8,0 von der Säule adsorbiert und Fremdprotein mit dem gleichen Puffer eluiert. Die Oxidase wurde mit 100 mM Tris/1 mM EDTA, pH 8,0 von der Cellulose gelöst. Das Elutionsdiagramm gibt Abb.7 wieder. Dies ergab eine 4fache Anreicherung bei einer Ausbeute um 40 %. Wegen der geringen Aktivität der Fraktionen wurden die Fraktionen eines Proteinpeaks in ihrem Maximum vereinigt, 60 % Ammonsulfat gesättigt und auf der Diskelektrophorese analysiert (Abb.8). Nicht von der Säule gelöste Proteine wurden mit 100 mM Tris/100 mM NaCl/1 mM EDTA, pH 8,0 (37°C) eluiert und ebenfalls

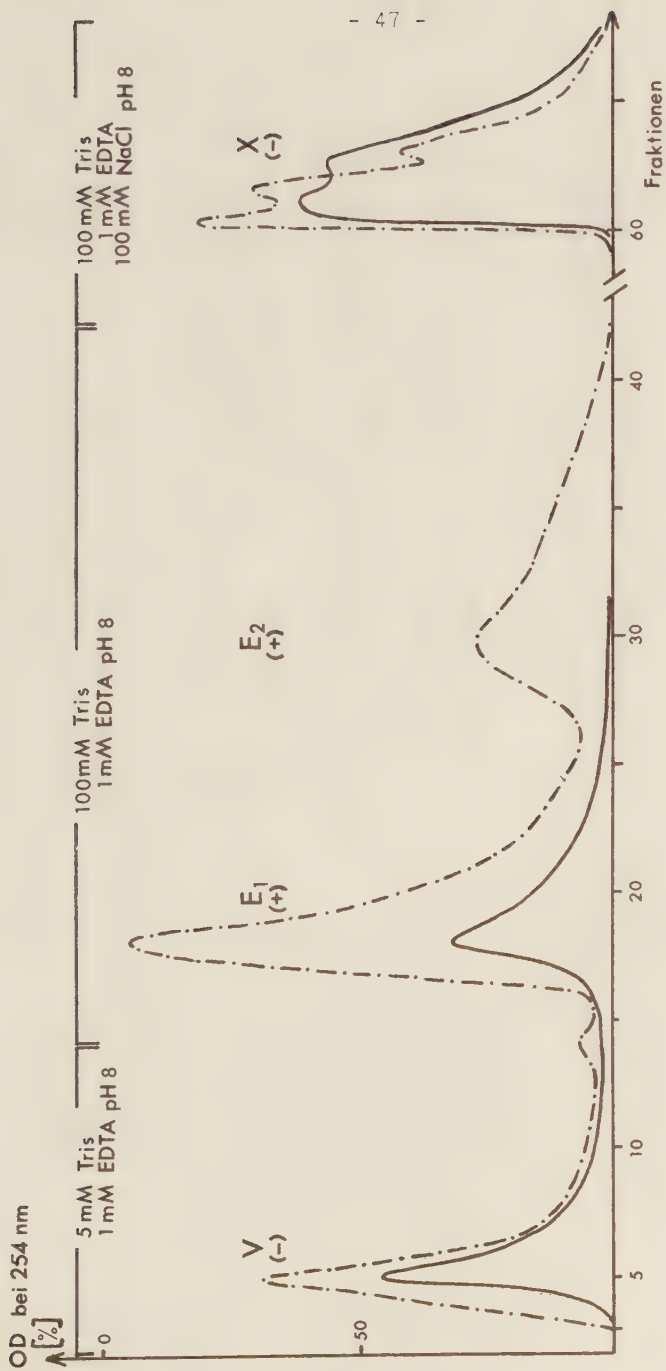


Abb. 7 Anreicherung der L-AOD an DEAE-Cellulose. Durchlässigkeit (OD) des Eluates von Cerberus rhynchops-leber (- -) und -Lunge (—) bei 254 nm, Fraktionsvolumen 5 ml/20 min; Ausgangspunkt für die einzelnen Anreicherungs-schritte waren 3 g Trockenpulver/Durchlauf.

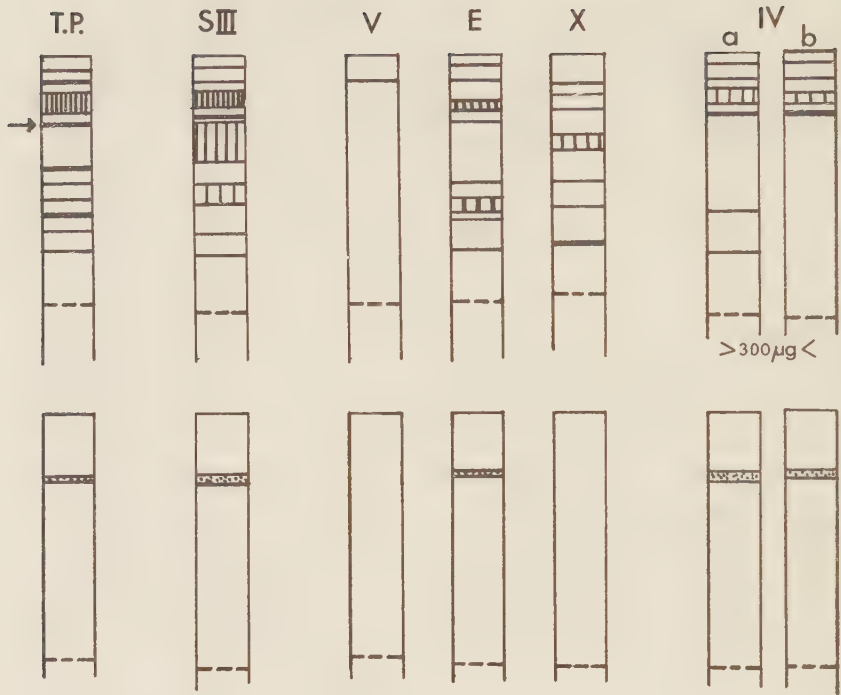


Abb.8 Auftrennung der Proteine von Trop.natrix-Le durch Disk-
elektrophorese während des Trennungsganges.
(System Nr.1, 7,5 % Gel, Probenmenge 300 µg Protein/Gel,
IV b nur 100 µg Protein/Gel). T.P.:Trop.natrix-Leber, Reini-
gungsstufe I: S III: 1.Ammonsulfatfällung, Reinigungsstufe II:
V: Vorlauf der DEAE-C; E: Eluat der Chromatographie an DEAE-C,
Reinigungsstufe III: X: Eluat mit 0,1M Tris-HCL/1 mM EDTA/
0,1 M NaCl pH 8,0 an DEAE-C; IV a.b.: 2.Ammonsulfatfällung,
Reinigungsstufe IV. (obere Reihe: Amidoschwarz 10 B, untere
Reihe: enzyme-spezifische Anfärbung)

Tab.11 Anreicherung der L-AOD aus Leber von Tropidonotus natrlix,
in Klammern die Werte für D-AOD.

Reinigungsstufe	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (mU)	spez.Aktivität (mU/mg Protein)	Ausbeute (%)	Anreichg.
I	1 950	1 365 (17 745)	0,70 (9,10)	100	1*
II	527	1 080 (4 548)	2,05 (8,63)	79 (26)	2,9
III	165	517 (1 688)	3,13 (10,2)	38 (10)	4,5
IV	31	183 (360)	5,90 (11,6)	14 (2)	8,4

*) Ausgangspunkt ist der 20 000g-Überstand des Acetontrockenpulvers, kein wässriges Organhomogenat.

Tab. 12 Anreicherung der L-AOD aus Lunge von Tropidonotus natrix und Cerberus rhynchops.

Reinigungsstufe	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (mU)	spez. Aktivität (mU/mg Protein)	Ausbeute (%)	Anreicherung
I	144	592	4,10	100	1*
II	25	255	10,2	43	2,5
III	6	107	17,8	18	4,3
I	155	186	1,20	100	1*
II	62	99	1,60	53	1,3
III	11	42	3,80	22	3,2

*) Ausgangspunkt ist der 20 000g-Überstand der Acetontrockenpulver, keine wässrigen Organhomogenate.

auf L-AOD-Aktivität geprüft (Abb.8 X); dabei ergab sich, daß die Aktivität mit 100 mM Tris/1 mM EDTA pH 8 vollständig von der Säule gelöst worden war (Reinigungsstufe III). In allen Versuchen war das Elutionsdiagramm der Leberextrakte zweigipfelig (E_1 und E_2); beide Konfigurationen hatten aber die gleichen Wanderungsgeschwindigkeiten auf der Disk-elektrophorese. Lungenextrakte wurden als einheitlicher Proteinpeak eluiert.

Die mit Ammonsulfat gefällten Fraktionen wurden gelöst, gegen den gleichen Puffer bei 4°C dialysiert (66,7 mM Tris/HCl pH 8,0) und der zweiten Ammonsulfatfraktionierung unterworfen. Das Sediment zwischen 35 und 45% Sättigung wurde wegen nur geringer L-AOD-Aktivität verworfen und der Überstand auf 60 % Ammonsulfatsättigung gebracht; nach Dialyse wurde die Aktivität bestimmt. Es ergab sich eine Anreicherung um das 8 bis 9fache mit einer Ausbeute von 10 bis 20 % (Reinigungsstufe IV).

Zur Aufbewahrung des angereicherten Enzyms wurde eine 60% Ammonsulfatlösung verwendet, in der über mehrere Monate hinaus kein deutlicher Aktivitätsverlust der L-AOD zu bemerken war. Tab.11 und 12 geben eine Zusammenfassung der Anreicherungs-schritte für Leber und Lunge. In Tab.13 werden beide L-Aminosäure-Oxidase mit anderen gereinigten L-Aminosäure-Oxidase verglichen.

Tab. 13 Spezifische Aktivitäten angereicherter L-AOD
verschiedener Herkunft

Spezies	spez.Akt. [mU/mg Prot.]	Anreicherung	Literatur
<i>Tropidonotus natrix</i>			
-Leber*	5,9	8,4	1
-Lunge*	17,8	4	1
<i>Vipera ammodytes</i>	4×10^3	25	2
<i>V. palestinae</i>	30×10^3	25	3
<i>Crotalus adamanteus</i> **	11×10^3	25	4,5
<i>Agkistrodon piscivorus</i>	50×10^3	-	6
Mattenniere**	33	280	7
<i>Bombyx mori</i> -Eier	188,5	1583	8
<i>Neurospora crassa</i>	$1,45 \times 10^3$	112	9
<i>Corynebacterium</i> ***	28,4	5,5	10
<i>Proteus vulgaris</i> ****	216	2,8	11

Literatur: 1. diese Arbeit

2. KURTH und AURICH (1973)
3. SHAHAM und BDOLAH (1973)
4. WELLNER und MEISTER (1960)
5. MASSEY UND CURTI (1968)
6. SINGER und KEARNEY (1950b)
7. NAKANO et al. (1967)
8. KOTAKA (1963)
9. AURICH et al. (1972)
10. COUDERT und VANDECASTEELE (1975)
11. STUMPF und GREEN (1944)

*) bezogen auf Basis Acetontrockenpulver; wässrige Organ-
homogenate enthalten die 3-4fache Proteinmenge.

**) kristallin

***) 25°C, alle anderen bei 37°C

****) pro mg Trockengewicht bezogen auf Zellsuspension

3.8. Charakterisierung der L-AOD

3.8.1. Reaktionskinetik

Die angereicherte L-Aminosäure-Oxidase der Schlangengane entspricht in allen Punkten dem Enzym aus Acetontrockenpulverextrakten (20 000 g Überstand).

3.8.1.1. Einfluß des pH

Abb.9 vergleicht den Einfluß des pH auf die Reaktionsgeschwindigkeit angereicherter L-AOD (Leber) und D-AOD (20 000 g Überstand = Reinigungsstufe I) bei Substratkonzentrationen, die optimal für das L-Enzym sind.

Die D-Aminosäure-Oxidase hat ein scharfes Optimum bei pH 8,4, das unabhängig von der Substratkonzentration ist; sie unterscheidet sich damit nicht wesentlich von dem Säuger-D-Enzym (DIXON und KLEPPE 1965c; FONDA und ANDERSON 1967). Die Oxidation von L-Phenylalanin nimmt dagegen erst im pH-Bereich unter 7 und über 9 ab; es liegt ein ausgesprochen breites pH-Optimum vor.

Mit L-Leucin als bevorzugtem Substrat vieler Schlangengift-L-AOD wird ein pH-Optimum von 7,2 bis 7,4 angegeben (SINGER und KEARNEY 1950b; ZELLER und MAKITZ 1944; WELLNER und MEISTER 1960; ZWISLER 1965). Das Optimum für das Säuger-L-Enzym liegt mehr im Basischen pH 8,7 (NAKANO und DANOWSKI 1966) und pH 10 (BLANCHARD et al. 1944). In einer detaillierten Untersuchung von PAIK und KIM (1965) zur Beziehung von pH und Substrat wird für das Crotalus-Enzym eine große Abhängigkeit des pH von der Art der Aminosäure festgestellt; der pH des Säuger-L-Enzyms ist davon wenig abhängig; der optimale pH-Bereich von 8,2 bis 9,6 für L-Phenylalanin und Crotalus-Enzym, sowie eine langsame Abnahme der Aktivität außerhalb dieser Grenzen, sind Eigenschaften, die auch für die Reaktion

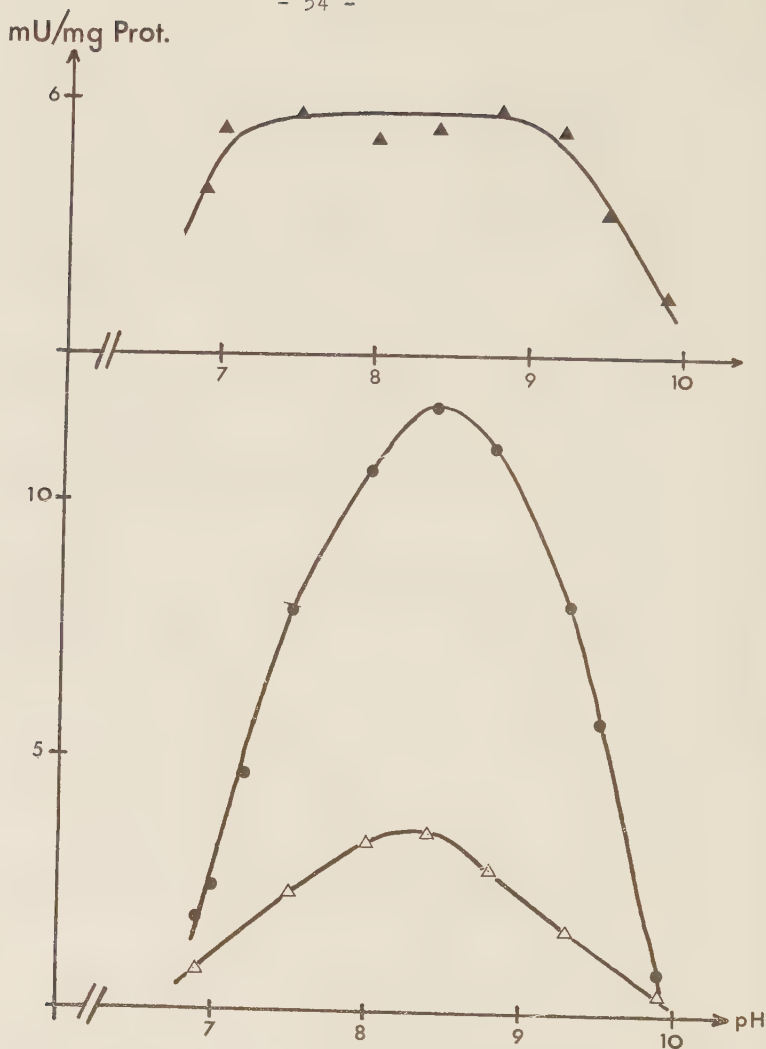


Abb.9 pH-Optima der L-AOD aus Trop.natrix-Leber (Reinigungsstufe IV) und der D-AOD aus Cerb.rhynchops und Trop.natrix-Leber (Reinigungsstufe I). Standardansatz für L-AOD: 7 mM L-Phe(▲), 30' U Kat, 50 μ l L-AOD, 66,7 mM Tris-HCl oder Glycin-NaOH im Gesamtvolumen $v=270\mu$ l, Gasphase: Sauerstoff 37°C. D-AOD: 7 mM D-Phe(△) und 14 mM D-Phe(●), 10^{-5} M FAD, sonst wie L-AOD.

mit der Schlangenorgan-L-AOD zutreffen. Ebenfalls ein breites pH-Optimum (pH 9,5) hat die aus Neurospora crassa gereinigte L-AOD (AURICH et al. 1972) (BURTON 1951); das Bakterien-Enzym hat ein gutausgebildetes Optimum mit L-Phenylalanin bei pH 6,8 (STUMPF und GREEN 1944). Die ungewöhnliche, durch Magnesiumionen aktivierbare L-AOD aus Cardium tuberculatum zeigt ein ausgeprägtes Optimum bei pH 7,6, das in Anwesenheit von Magnesiumionen einen ganzen pH-Wert zum Basischen hin verschoben werden kann (ROCHE et al. 1959).

3.8.1.2. Einfluß der Substratkonzentration

Aus Abb.10 geht hervor, daß hohe Substratkonzentrationen den L-Phenylalanin-Umsatz sowohl in Kontrakten der Niere (Reinigungsstufe I) als auch in angereicherten Präparationen der Leber (Reinigungsstufe IV) hemmen. Eine optimale Konzentration liegt vor zwischen 7 und 14 mM, danach kommt es zu einer geringen Abnahme von Sauerstoffverbrauch und Ketosäurebildung.

Entsprechende Beobachtungen machten ZELLER und MARITZ (1944, 1945a) an Rohgiften in Gegenwart von L-Leucin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Histidin. Mit schwachen Substraten tritt keine Hemmung auf (WELLNER und MEISTER 1961), außerdem ist der Grad der Hemmung abhängig von der Sauerstoffkonzentration; mit Luft als Gasphase hemmt L-Leucin bereits bei Konzentrationen über 4 mM, während bei reinem Sauerstoff die optimale Substratkonzentration bei 8 mM liegt. Unter gleichen Meßbedingungen hemmt L-Valin nicht bis zu 300 mM, bei 5% Sauerstoff tritt auch für L-Valin Hemmung auf.

Im Zuge kinetischer Messungen der L-Aminosäure-Oxidase-Reaktion fanden PORTER und BRIGHT (1972a) eine langsame Abnahme des Sauerstoffverbrauchs bis 75 mM L-Phenylalanin.

ZELLER (1948) machte für den Mechanismus der Substrathemmung einen inaktiven Komplex zwischen Enzym und Aminosäure verantwortlich; SINGER und KEARNEY (1950b) vermuteten Konkurrenz zwischen Substrat und Sauerstoff. WELLNER und MEISTER (1961) postulierten für den Reaktionsmechanismus der L-AOD binäre Komplexe und machten für die Hemmung eine Zweischnitt-Reduktion des Enzyms durch die Aminosäure verantwortlich. Das halbreduzierte Enzym reagiert mit Sauerstoff oder einem weiteren Molekül Aminosäure; die Hemmung tritt ein, sobald das halbreduzierte Enzym schneller mit Sauerstoff reagiert als das total-reduzierte. Die Ergebnisse von MASSEY und CURTI (1967) bestätigen die Art der Hemmung, der Mechanismus der L-AOD-Reaktion verläuft dagegen ähnlich wie der der D-AOD und erfordert ternäre Komplexe zwischen Enzym, Substrat und Sauerstoff. KOSTER und VEEGER (1968) fanden sowohl für D-AOD als auch für L-AOD (Gift) zwei verschiedene Enzymformen, deren Umwandlung in einander temperaturabhängig ist. Beide Konformationen stehen im Gleichgewicht miteinander und das jeweilige Substrat zeigt verschiedene Affinität zu beiden Formen. Für diesen Mechanismus spricht die unter bestimmten Bedingungen mit D-Valin auftretende Hemmung der D-Aminosäure-Oxidase, die mit D-Alanin nicht festgestellt werden kann; auch dies ist eine Eigenschaft, die das D-Enzym mit dem L-Enzym aus Schlangengiften gemeinsam hat.

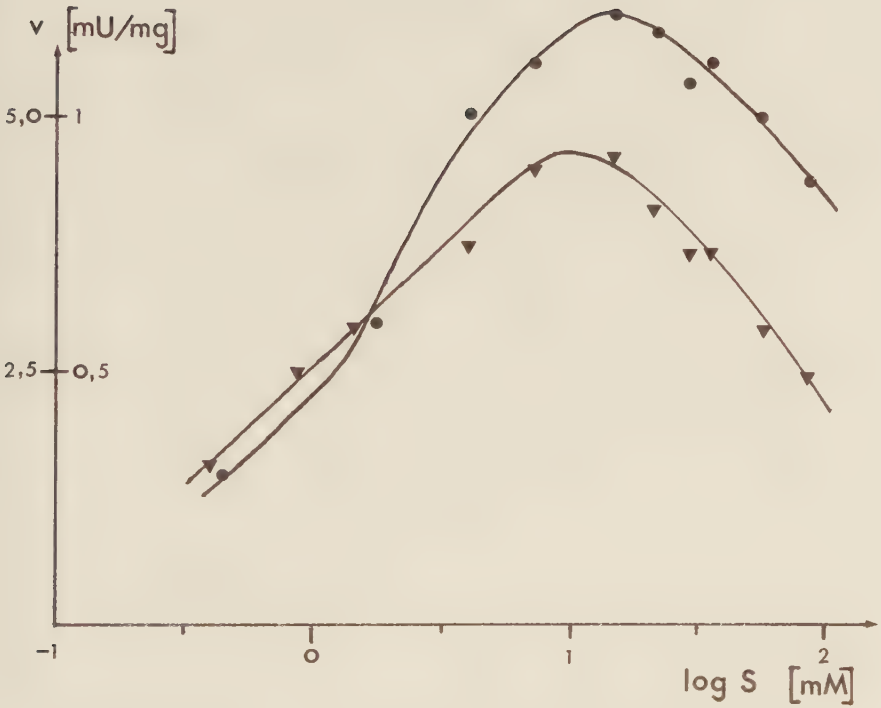


Abb.10 Abhängigkeit des L-Phenylalanin-Umsatzes von der Substratkonzentration gemessen an Leberenzym der Reinigungsstufe IV (●) und Nierenenzym der Reinigungsstufe I (▼).

3.8.1.3. Michaeliskonstante

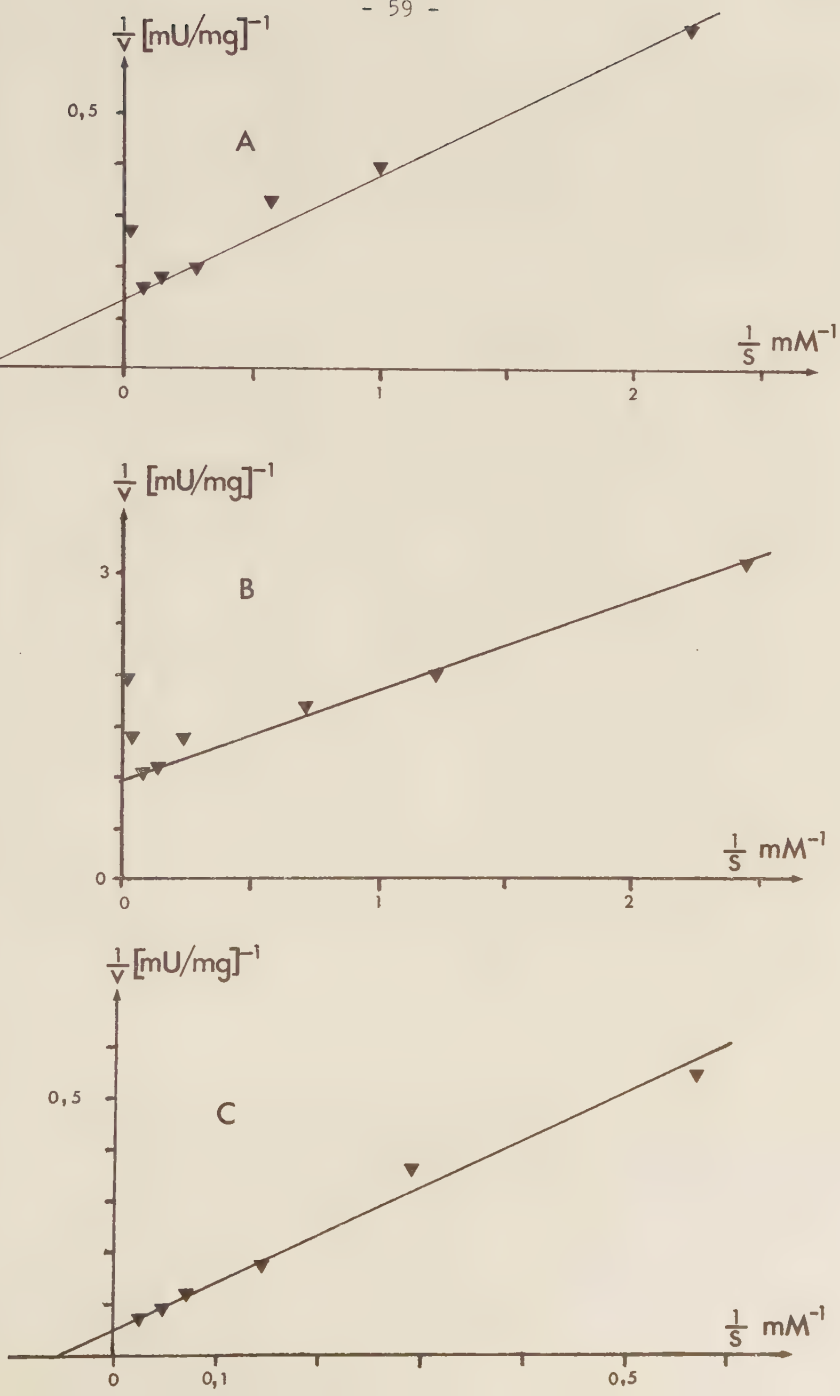
Um die Affinität zwischen Enzym und Substrat zu bestimmen, wurde die L-AOD-Aktivität mit 6 bis 10 L-Phenylalaninkonzentrationen im Bereich von 0,5 bis 80 mM gemessen; die graphische Auftragung nach LINEWEAVER-BURK (1934) war linear bei Substratkonzentrationen, die nicht zu einer Überschubhemmung führten (Abb.11 A; vergl. Abb.10). Rohextrakt (Reinigungsstufe I) von Tropidonotus natrix-Niere brachte das gleiche Ergebnis, während D-Aminosäure-Oxidase (Reinigungsstufe I) mit der entsprechenden Aminosäure keine Überschubhemmung zeigte (Abb.11 B,C).

Die scheinbare Michaeliskonstante K_m , gemessen in 100 % Sauerstoffatmosphäre unter Standardbedingungen, beträgt für L-Phenylalanin 1,85 mM bzw. 0,6 mM für das ungereinigte Enzym der Niere; die K_m für D-Phenylalanin beträgt 18,2 mM und liegt eine ganze Zehnerpotenz höher als die des L-Enzyms.

Daß die Affinität zwischen Enzym und jeweiligem Substrat sehr unterschiedlich sein kann, abhängig davon, welcher pH und welche Konzentration des zweiten Substrats Sauerstoff vorliegen, untersuchten PAIK und KIM * (1965), MASSEY und CURTI (1967) für das Schlangengiftenzym und DIXON und KLEPPE (1965 b,c), MASSEY et al. (1965) für das Säugerenzym der D-Form; analoge Untersuchungen der Kinetik der L-AOD aus Neurospora crassa folgten von LUPPA und AURICH (1971).

*) PAIK und KIM L-AOD: K_m von $1,13 \times 10^{-3} M$ (L-Hist; pH 8,5) bis $3,10 \times 10^{-1} M$ (L-Orn; pH 7,1) bei optim. pH 7,2-9,0. DIXON und KLEPPE D-AOD: $K_m = 1,8 \times 10^{-3} M$ (D-Ala; Luft); $1,8 \times 10^{-4} M$ (D-Ala; ∞O_2).

Abb. 11 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v von der Substratkonzentration S bei pH 8 (37°C). A: L-AOD (Reinigungsstufe IV)-Leber; B: L-AOD (Reinigungsstufe I)-Leber; L- bzw. D-Phenylalanin.



Ein Vergleich mit Michaeliskonstanten anderer Aminosäure-Oxidase läßt sich nur ziehen unter Berücksichtigung gleicher Versuchsbedingungen, die aber nur selten in der vorliegenden Literatur zu finden sind. In der Tab.14 sind daher nur Werte für scheinbare Michaeliskonstanten unter nahezu gleichen Bedingungen aufgeführt.

Bei einem Vergleich der Werte fällt die gute Übereinstimmung zwischen Giften und Organen der Schlangen auf; erst mit L-4-Hydroxysäuren würde die K_m des Säugerenzym in dieser Größenordnung liegen, da die Affinität zu diesen Substraten viel besser ist (NAKANO und DANOWSKI 1966; CROMARTIE und WALSH 1975a). Auffällig sind die Unterschiede von zwei Zehnerpotenzen zwischen Michaeliskonstanten der gleichen Art (Crotalus adamanteus-Gift) oder verwandter Arten (Proteus und Corynebacterium), die aber nicht diskutiert werden. Offensichtlich unterscheiden sich Anfangsgeschwindigkeiten, die polarographisch bestimmt wurden, von solchen, die auf manometrische Weise erzielt wurden; dies scheint aber nur für bestimmte L-Aminosäure-Oxidase zu gelten. Völlige Übereinstimmung herrscht zwischen Michaeliskonstanten der D-AOD der Säugerniere, die auf die eine oder andere Art bestimmt wurden (MASSEY et al. 1961; DIXON und KLEPPE 1965 c) *, und auch für die Michaeliskonstanten der L-AOD aus Rattenniere (CROMARTIE und WALSH 1975a,b).

*) DIXON und KLEPPE D-Ala: $K_m = 1,8 \times 10^{-3}$ (Luft; pH 8,5 ; 25° polarographisch)

MASSEY et al. D-Ala: $K_m = 1,6 \times 10^{-3}$ (Luft; pH 8,3 38°)

Tab.14 Vergleich der scheinbaren Michaeliskonstanten verschiedener L-Aminosäure-Oxidasen.

Species	L-Leu	K _m [M]	L-Phe	Meßbedingungen
Kattenniere	1,31x10 ⁻²			NAKANO und DANOWSKI (1966) Luft; pH 8,9; 37°
Agkistrodon pisciv.-Gift	1,0 x10 ⁻³			SINGER und KEARNEY (1950b) Luft=O ₂ ; pH 7,1; 30°
Vipera russelli-Gift			2,2 x10 ⁻³	ZELLER et al. (1965) O ₂ ; pH 7,2; 38°
Naja melanoleuca "			1,7 x10 ⁻³	"
Crotalus adamanteus "			1,7 x10 ⁻³	"
C. " "	1,2 x10 ⁻³			MASSEY und CURTI (1967) Luft=O ₂ ; pH 7,8; 0-1° polarogr.
C. " "			0,8 x10 ⁻⁵	ZELLER et al. (1974) Luft; pH 7,6; 38°; polarographisch
Tropidonotus natrix **				
-Leber			1,85x10 ⁻³	diese Arbeit; O ₂ ; pH 8,0; 37°
-Niere			0,6 x10 ⁻³	" "
Cardium tuberculatum				
-Hepatopancreas	6,4 x10 ⁻³			ROCHE et al. (1959) Luft; pH 7,6; 30°; (extrapoliert)
Bombyx mori-Eier	0,3 x10 ⁻³			KOTAKA (1963) Luft; pH 7,2; 37°
Neurospora crassa			2,7 x10 ⁻⁵	LUPFA und AURICH (1971) Luft; pH 9,5; 30°; polar. (extr.)
Proteus vulgaris			6,0 x10 ⁻³	STUMPF und GREEN (1944) Luft=O ₂ ; pH 7,1; 38°
P. rettgeri	2,6 x10 ⁻³		3,1 x10 ⁻³	DUERRE und CHAKRABARTHY (1975) Luft; pH 7,6; 30°
Corynebacterium			1,1 x10 ⁻⁵	COUDERT und VANDECASTELLE (1975) Luft; pH 8; 25° polar.

*) polarographisch = Anfangsgeschwindigkeit der ersten 3 Minuten!

**) T. natrix-Leber D-Phe 1,82x10⁻² diese Arbeit; O₂; pH 8,0; 37°
 Schweineniere D-Phe 1,6 x10⁻³ DIXON und KLEPPE (1965b) Luft; pH 8,5; 25°; polar.
 Rinderniere D-Ala 2,0 x10⁻³ HORIIKE und MIYAKE (1971) Luft; pH 8,5; 38°; polar.

3.8.2. Substratspezifität

Die Tab.15 und 16 zeigen eine Zusammenstellung der relativen Aktivitäten von L- und D-Aminosäure-Oxidasen verschiedener Herkunft.

L-AOD aus Schlangengift (2) ist streng spezifisch für die L-Konfiguration der Aminosäure; es werden aber alle angebotenen Monocarbonsäuren mit NH_2 -Gruppe in α -Stellung mit Ausnahme von L-Prolin oxidiert (ZELLER und MARITZ 1944; 1945a; ZELLER et al. 1945b). Selbst das optisch inaktive Glycin wird bei ausreichend großen Substrat- und Enzymkonzentrationen nachweislich umgesetzt (ZELLER et al. 1965; LICHTENBERG und WELLNER 1968).

Das Säuger-L-Enzym (1 und 1a) setzt weniger verschiedene Aminosäuren um; es ist inaktiv gegenüber basischen und sauren Aminosäuren, sowie gegenüber Serin und Threonin (NAKANO und DANOWSKI 1966; PAIK und KIM 1965). Glycin kann nicht oxidiert werden, dagegen aber L-Prolin und N-Methyl-substituierte L-Aminosäuren, besonders N-Methyl-L-Leucin, das am schnellsten zur α -Ketosäure oxidiert wird (BLANCHARD et al. 1944). L-Lactat wird unter den L- α -Hydroxysäuren 4mal schneller als L-Leucin desaminiert (NAKANO und DANOWSKI 1966, 1967), nach neuesten Untersuchungen sogar 12mal schneller (CROMARTIE und WALSH 1975). Außerdem wird nochmals vorgeschlagen, diese L-AOD der Säuger eher als eine L- α -Hydroxysäure-Oxidase zu bezeichnen wegen der ungleich größeren Oxidationsrate von L- α -Hydroxysäuren.

Diese Umbenennung der Säuger-L-Aminosäure-Oxidase könnte aber zu Verwechslungen führen mit der lang- und kurzkettigen L- α -Hydroxysäure-Oxidase (EC 1.1.3.1), die von ROBINSON et al. (1962) aus Schweinenieren und mit ähnlichen Eigenschaften von NAKANO et al.

Tab. 15 Substratspezifität von L-Aminosäure-Oxidasen;
relative Aktivität gegen L-Leucin [%].

L-AS	1*	1a	2	3	4	5	6**	7	8	9	***
Ala	6	3,5	3,4	41	(+)	1,5	-	0	53	89	0
α -Aminob.	3	-	70	-			-	127	82	-	-
Arg	0	0	24	183	++	0	52	111	22	30	79
Asp	0	0	0,15	<5		-	-	0	6,4	2	0
AspNH ₂	-	-	4,5	8,3		-	-	-	-	89	50
Cit	-	-	68	133		-	42	-	45	-	94
Cys	-	-	-	6,0		-	-	164	-	75	-
CysCys	15	-	-	-		-	-	-	72	72	-
Glu	0	0	0,5	<5		6	-	39	12	19	0
GluNH ₂	-	-	12	10		-	-	-	-	85	-
Hist	9	-	22	50	++	100	55	136	47	13	116
Hypro	-	-	-	0		-	-	-	-	-	-
Ileu	71	14	52	25		1,5	31	69	42	-	0
Leu	100	100	100	100	+	0	100	100	100	100	100
Lys	0	0	3,3	17	++	0	37	-	18	97	92
Meth	81	74	132	233	+	-	119	100	51	26	106
Norleu	89	-	-	-		-	-	-	-	-	-
Norval	53	-	-	-		-	-	-	-	-	-
Orn	0	0	-	50	++	-	58	151	65	-	116
Phe	45	33	62	170	+	0	119	79	52	70	94
Pro	77	-	0†	0		-	-	0	0	72	0
Ser	0	0	0,3	8,3		0	-	60	10	-	0
Thr	0	-	0,2	<5		-	-	0	3	-	-
Try	40	34	-	130		-	74	71	35	-	93
Tyr	20	11	-	125	+	-	73	102	21	-	103
Val	28	5,3	9	100		-	-	33	7,7	-	0
Glycin	0	0	0,1	<5		11	0‡	0	1,5	98	0
N-Me-Leu	115	-	0	0		-	0‡	-	-	-	-
HyS	+++	+++	0	0		-	-	-	-	-	-

*) Literaturangaben auf der folgenden Seite

**) Es handelt sich um zwei im Zuckergradienten voneinander trennbare Oxidasen, von denen die eine vorwiegend basische Aminosäuren oxidiert.

†) ZELLER et al. (1946); ‡) STUMPF und GREEN (1944)

***)) Vergl. ROCHE et al. (1959)

Fortsetzung Tab. 15

- Literatur: 1. Rattenmilch: BLANCHARD et al. (1944)
1a Rattenmilch: NAKANO et al. (1967)
2. Crotalus adamanteus-Gift: LICHTENBERG
und WELLNER (1968)
3. Tropidonotus natrix-Leber: diese Arbeit
4. Truthahnleber: BOULANGER und OSTEUX (1956)
5. Hühnerembryo-Leber: CORRIGAN (1972)
6. Proteus rettgeri: DUERRE u. CHAKRABARTHY (1975)
7. Corynebacterium: COUDERT und VANDECASTEELE
(1975)
8. Penicillium: BENDER und KREBS (1950),
BURTON (1951)
9. Bombyx mori-Eier: KOTAKA (1963)
10. Mytilus sp.: GLAHN et al. (1955)

Tab. 16 Substratspezifität von D-Aminosäure-Oxidasen; relative Aktivität (%) gegen D-Alanin bzw. D-Aspartat.

D-AS	1*	1a	1b	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ala	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0
α -Aminob.	14	-	-	48	-	-	188	305	-				
Arg	-	30	-	-	-	16	-	-	0				
Asp	0	++	15	2	8	-	46**	-	33	100	100	100	100
AspNH ₂	0	-	<5	-	16	-	-	-	0				
Cys	-	-	0	-	-	-	-	-	-		22 ⁺⁺	5 ⁺⁺	11 ⁺⁺
CysCys	-	-	-	3	16	-	-	-	-				
Glu	0	+	-	0	-	0	108	-	100**	14	16	6	34
GluNH ₂	-	-	-	-	8	-	-	-	-				
Hist	25	+++	14	10	20	35	116	-	0				
Hypro	+	-	80	-	90	-	-	-	-				
Ileu	91	103	155	34	30	79	70	27	0				
Leu	22	-	95	22	125	67	100	405	0				
Lys	+	+++	5	1	20	-	-	-	0				
Meth	110	110	102	125	175	-	129	276	0				
Norleu	82	-	75	31	-	-	132	105	-				
Norval	11	96	-	48	-	-	165	427	0				
Orn	27	+++	-	5	41	-	-	-	0				
Phe	92	-	85	40	200	116	-	212	0				
Pro	302	126	170	231	86	-	87	-	0				
Ser	49	36	22	65	33	51	44	-	0				
Thr	27	++	16	3	20	-	-	-	0				
Try	45	-	32	58	75	-	30	-	0				
Tyr	+	-	120	296	50	-	-	-	-				
Val	68	80	70	55	-	-	64	-	0				
Gly	15	++	12	-	<5	21	-	-	0				
N-Me-Leu	-	0	10	-	0	-	-	-	-				
HyS	0,1 ⁺)	-	0	-	-	-	-	-	-				

*) Literaturangaben auf der folgenden Seite

**) Die Aktivität gegenüber Amino-dicarbonsäuren beruht auf der Anwesenheit eines 2. Enzyms (D'ANIELLO und ROCCA 1972).

***) Ferricyanid als Wasserstoffacceptor

+) YAGI et al. (1969)

++) Nach DE MARCO und RINALDI (1972) werden von der D-Aspartat-Oxidase auch Amino-dicarbonsäuren, deren α -Carboxylgruppe durch ein Schwefelradikal substituiert ist, oxidiert. (z.B. D-Cysteinsäure).

Fortsetzung Tab. 16

- Literatur:
1. Schweineniere (DIXON und KLEPPE 1965)
 - 1a Schweineniere (SCANNONE et al. 1964)
 - 1b Schweineniere (diese Arbeit)
 2. Hammelniere (BENDER und KREBS 1950)
 3. Tropidonotus natrix-Leber (diese Arbeit)
 4. Hühnerembryo-Leber (CORRIGAN 1972)
 5. Octopus-Leber (BLASCHKO und HAWKINS 1952)
 6. Helix-Leber (BLASCHKO und HAWKINS 1952)
 - 7.8. D-Aspartat-Oxidase-Kaninchenniere
(DIXON und KENWORTHY 1967)
 9. Kaninchenniere und
 10. Rinderniere und
 11. Schweineniere-D-Aspartat-Oxidase (DE MARCO und RINALDI 1972)

(1968b) und USHIJIMA und NAKANO (1969) aus Rattenleber isoliert wurde. L- α -Hydroxysäure-Oxidase, neben Katalase ein Hauptbestandteil der Peroxisomen von Rattenleber (HAND 1975), verändert im Lauf der Ontogenese die Aktivität seiner beiden Isoenzyme, L-Aminosäuren werden nicht umgesetzt (MILES und HOLMES 1975). Die Angabe, ob L-Leucin oxidiert wird, wäre ein allgemeines Unterscheidungsmerkmal für beide Oxidasen.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse sind die Werte für die angereicherte L-AOD aus Tropidonotus natrix-Leber (Tab.15, 3) zu betrachten. L- α -Hydroxysäuren, N-Methyl-D,L-Leucin, sowie L-Prolin und L-Hydroxyprolin sind die einzigen der untersuchten Substrate, die von dem angereicherten Enzym nicht oxidiert werden; das zeigt sowohl die manometrische als auch die Messung der α -Ketosäuren. Die geringe positive Reaktion der L-AOD (Reinigungsstufe I) mit N-Methyl-D,L-Leucin nach 16-stündiger Incubation auf der Diskelektrophorese kann zwei verschiedene Ursachen haben. 1. Es handelt sich dabei um keine enzymkatalysierte Reaktion; photosensibilisierte Oxidation der Flavoproteine durch Flavine ist mehrfach beschrieben worden (TU und McCORMICK 1973; BOWEN und YANG 1975; COLOMBETTI et al. 1975; JOHNSON et al.1975). 2. N-Methyl-substituierte Aminosäuren werden von der D-Aminosäure-Oxidase der Schlangenleber umgesetzt (Tab.16, 1b), wenn auch nur mit geringer Oxidationsrate und kaum vergleichbar mit dem Säuger-L-Enzym (s. Tab.15, 1).

Nach MARCHI und JOHNSTON (1969) werden Glycin und N-Methyl-D-Aspartat vom Hammel-Cerebellum mit 2 % der Rate des Alanins abgebaut, D-AOD aus Schweinenieren hat eine noch wesentlich geringere Oxidationsrate. D-Lactat wird nur mit einem Tausendstel der Geschwin-

digkeit des Alanins oxidiert (YAGI et al. 1969); D,L-Hydroxybuttersäure ist unter den hier vorliegenden Meßbedingungen kein Substrat der D-AOD aus Schweinen (Schuchardt). Da auch Rohextrakte (Reinigungsstufe I) von Lunge, Blut und Herz weder D-Aminosäure-Oxidase enthalten noch die fraglichen Aminosäuren und Hydroxysäuren umsetzen, ist die Oxidation von N-Methyl-D,L-Leucin durch Schlangenleber auf vorhandene D-AOD zurückzuführen. Die D-Aminosäure-Oxidase der Säuger baut bei Vergleichsmessungen N-Methyl-D,L-Leucin mit 10 % der Rate des Alanins ab (Tab.16, 1b); die in der Literatur beschriebene Oxidation von D- α -Hydroxysäuren durch das D-Enzym liegt unterhalb der Nachweisgrenze der Methode, handelt es sich doch bei den Werten für D-AOD nur um Vergleichswerte und keinesfalls um Maximalgeschwindigkeiten unter optimalen Bedingungen.

Es ist anzunehmen, daß die Oxidation der sauren D-Aminosäuren auf D-Aspartat-Oxidase zurückzuführen ist, wie sie für Säuger und Invertebraten verschiedentlich beschrieben worden ist (DIXON und KENWORTHY 1967; DE MARCO und RINALDI 1972; D'ANIELLO und ROCCA 1972; D'ANIELLO et al. 1975; URICH 1968). Dem gegenüber erfolgt die Oxidation der sauren L-Aminosäuren durch das L-Enzym der Schlangenleber, das Crotalus-Enzym setzt diese Aminosäuren unter den gleichen Bedingungen noch nicht um; die Affinität der sauren Aminosäuren ist wesentlich geringer; erst die Erhöhung der Enzymkonzentration bringt ein positives Ergebnis (LICHTENBERG und WELLNER 1968).

Zwischen den Substratspektren von L-AOD aus Schlangengift (2) und Schlangenorgan (3) besteht gute Übereinstimmung; vom Säugerenzym sind beide klar abzugrenzen, zu den L-Aminosäure-Oxidasen der Bakterien und Schimmelpilze besteht eine gewisse Gemeinsamkeit.

Daß sich die einzelnen Schlangengift-L-AOD je nach Art und Familienzugehörigkeit in der Höhe ihrer Oxidationsraten unterscheiden können, berichteten bereits mehrere Autoren (ZELLER und MAHITZ 1945a; ZELLER 1948; SINGER und KEARNEY 1950b).

3.8.3. Prosthetische Gruppe

Die Isolierung der prosthetischen Gruppe der L-Aminosäure-Oxidase erfolgte aus dem angereicherten Enzym aus Tropidonotus natrix-Lunge (Reinigungsstufe III), Zum Vergleich und zur Kontrolle der Methode wurde Crotalus adamanteus-L-AOD der gleichen Behandlung unterworfen. Das Elektropherogramm der L-AOD (Lunge) zeigt Abb.12.

Die Extraktion der L-AOD aus den Polyacrylamid-Gelscheiben brachte eine Ausbeute von 55 % an aktivem Enzym für beide Oxidasen. Extrakt von Gelscheibchen ober- und unterhalb der im Referenzgel mit o-Dianisidin-HCl kenntlich gemachten L-Aminosäure-Oxidasen enthielt keine nachweisbare Enzymaktivität; diese Proben wurden bei der weiteren Isolierung als Reagenzien-leerwert benutzt.

Der Wiederfund käuflicher, auf mikrokristalliner Cellulose gereinigter Flavine (s. 2.14) nach Säurefällung und Gefriertrocknung war vollständig; eine Umwandlung von FAD konnte nicht festgestellt werden, so daß diese Arbeitsmethode keinen schädigenden Einfluß auf die Isolierung des Flavinateils der L-Aminosäure-Oxidase haben konnte.

Die enzymatische Prüfung des Flavinateils durch den gekoppelten Test mit LDH und D-AOD-Apooxidase zeigte, daß das freigesetzte Flavin in Form von FAD vorliegt.



Abb.12 Elektrophoretische Auftrennung der löslichen Proteine von Trop. matrix-Lunge (Reinigungsstufe III, Eluat der DEAE-C)!
a und b:Amidoschwarz 10B,
c: enzymespezifische Färbung mit o-Dianisidin-HCl, 5 mM L-Phe.
Gelsystem Nr.1 - 7,5% Gel.

Der Gehalt an Flavin-adenin-dinucleotid aus L-AOD der Ringelnatter-Lunge beträgt 7,6 µg FAD pro mg Protein.

Unter der Annahme, daß die gesamte Menge des aus Gelen extrahierten Proteins Enzymprotein ist, und unter der weiteren Annahme, daß auch vom Schlangenorgan-Enzym 2 Mol FAD/Mol Enzym gebunden werden, errechnet sich mit dem bekannten Molekulargewicht ein Reinheitsgrad von etwa 60 %.

Die Prüfung der gleichbehandelten L-AOD aus Cerberus rhynchops-Lunge (Reinigungsstufe III) auf der Dünnschichtchromatographie erbrachte gleiche R_F -Werte für FAD und das unbekannte Coenzym (Tab.17).

Im übrigen differieren die R_F -Werte der Flavine im

gleichen Laufmittel, papierchromatographisch bestimmt, bei den verschiedenen Arbeitsgruppen (YAGI 1962; RAO et al. 1963; WILSON und KING 1964).

Tab.17 Dünnschichtchromatographie der prosthetischen Gruppe von L-AOD (Lunge); R_f -Werte.

Laufmittel	Ribo	FMN	FAD	Enzymflavin
Na_2HPO_4 , pH 7	0,24	0,50	0,35	0,35

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß das natürliche Coenzym der L-AOD aus Schlangenorganen FAD ist. Die Wahrscheinlichkeit wäre wesentlich höher, würde eine größere Menge Enzym zur Verfügung stehen, und würde es gelingen, ein natives Apoenzym zu gewinnen, um die Wiederherstellung der Enzymaktivität mit Flavinanalogen spektrophotometrisch zu verfolgen. Weitere Untersuchungen konnten aus Mangel an Substanz nicht durchgeführt werden; allerdings erscheint es nach allen anderen, in dieser Arbeit beschriebenen, Eigenschaften der Schlangenorgan-Oxidase gerechtfertigt diesem Ergebnis Aussagekraft beizumessen.

Die L-Aminosäure-Oxidase aus Schlangenorganen hat das gleiche Coenzym wie das Enzym aus Schlangengiften und wie das D-Enzym aus Leber, Niere und Darm der untersuchten Schlangen. Der Wert des exakten Flavingehalts pro Enzymmolekül bedarf noch weiterer Untersuchung; die L-AOD der Schlangengifte enthält 2 Mol FAD/Mol Enzym (WELLNER und MEISTER 1960; SINGER und KEARNEY 1950b; KURTH und AURICH 1973), das Neurospora-L-Enzym dagegen 4 Mol FAD/Mol Enzym (AURICH et al. 1972) und der Gehalt von FMN im Säuger-L-Enzym ist von 6 Mol FMN/Mol Enzym (NAKANO et al. 1968a) auf nur 2 Mol FMN/Mol Enzym berichtigt worden (CROMARTIE und WALSH 1975a).

4. SCHLUSSBETRACHTUNG

Auf Grund der in dieser Arbeit berichteten Ergebnisse kann die Frage beantwortet werden, zu welcher Gruppe von L-Aminosäure-Oxidasen das Enzym der Schlangenorgane gerechnet werden kann.

Die vergleichende Betrachtung hat gezeigt, daß die Schlangenorgane ein L-Enzym enthalten, das in physico-chemischen Eigenschaften und auch in kinetischen Merkmalen mit dem Schlangengift-Enzym weitgehend übereinstimmt.

Eine Ausnahme macht das L-Enzym aus Schlangenorganen mit seiner Oxidationsrate, sie ist außerordentlich niedrig und ist so vergleichbar mit der des Säuger-L-Enzyms.

Kongifte verschiedener Giftschlangenfamilien haben eine L-AOD-Aktivität, die um ein Vielfaches die Aktivität der Ringelnatter-L-AOD übertrifft (GRILLO RODRIGUEZ 1974; KOCHOLATY et al. 1971). Allerdings enthalten die eigentlichen Orte der Sekretion, die Giftdrüsenzellen, bis zu einem Hundertstel weniger Enzym als das Gift im Lumen der Drüse (BROWN 1974, BROWN et al. 1975). In diesem Zusammenhang erhebt sich die Frage nach Unterschieden in der Syntheserate des Schlangenzym, nach möglichen Permeabilitätsänderungen der Zellmembran. Es müßte auch geklärt werden, in welchen Ultrastrukturen der Zelle die L-AOD aus Schlangenorganen zu finden ist, ob sie wie die Säugerenzyme, L- und D-Aminosäure-Oxidase und L- α -Hydroxysäure-Oxidase mit Katalase in den Peroxisomen assoziiert ist und so zur Peroxid-Atmung beigetragen hat (DE DUVE und BAUDHUIN 1966); möglicherweise ist dem Enzym im Laufe der Evolution eine neue Aufgabe zugefallen.

Zu klären bleibt auch noch, worin die Ursache liegen könnte für die Bildung von zwei, so ähnliche Funktion ausübende, im Co-enzym aber so verschiedene L-Aminosäure-Oxidasen wie es Schlangen- und Säugerenzym sind. So fragt sich, welcher Enzymtyp bei den anderen Vertebratenklassen vorherrschend sein wird. Es würde sich die Möglichkeit ergeben, aus einem dann bekannten Verbreitungsmuster der beiden Enzyme einen phylogenetischen Zusammenhang zu sehen, der mit der Klassifikation der Vertebraten in Übereinstimmung gebracht werden könnte. Ein Vergleich phänotypischer und biochemischer Merkmale würde mehr

Aussagekraft für verwandtschaftliche Beziehungen haben. Dies müßte durch vergleichende Messungen an möglichst vielen Species geklärt werden.

Bei den Vögeln ist bereits eine in ihrer Substratspezifität weiter differenzierte L-AOD gefunden worden, die durch die Oxidation von vorwiegend basischen Aminosäuren sehr der L-AOD aus Schlangenorganen und Gift ähnelt, aber noch nicht ausreichend beschrieben worden ist.*) Überhaupt beziehen sich Literaturzitate nur gelegentlich auf L-AOD anderen Ursprungs. Unsicherheit besteht sogar schon, soll an Hand der Literatur entschieden werden, in welchen Säugerorganen L-AOD überhaupt zu finden ist. In dieser Beziehung kann auf ältere Hinweise von KREBS (1935), die das Vorkommen von L-AOD in Geweben verschiedenster Labortiere beschreiben, nicht Bezug genommen werden, da nicht sicher ist, ob damals nicht nur ein gekoppeltes Enzymsystem gemessen worden ist. Andere Untersucher berichten, Rattenniere wäre die einzige ergiebige Quelle zur Gewinnung einer L-AOD (BLANCHARD 1944, 1945; NAKANO und DANOWSKI 1966, NAKANO et al. 1967). DOMENECH und BLANCO (1967) deuten wenigstens an, daß das Enzym auch noch in anderen Rattenorganen zu finden ist. Eigene Vorversuche haben ergeben, daß es L-AOD neben Leber auch in Lunge und Pankreas gibt, und daß das Enzym aus Hammelnieren jahreszeitlichen Aktivitätsschwankungen unterworfen ist; die spezifischen Aktivitäten sind 50 % geringer als diejenige der L-AOD aus Rattenniere.

Bemerkenswert ist die Übereinstimmung der beiden stereospezifischen Schlangenorgan-Oxidasen in Nettoladung und Molekülgröße. Obwohl ein wichtiger Faktor, die unterschiedlich feste Coenzymbindung am Enzymprotein auffällt, scheint dieser Unterschied nur die Bindungastelle zwischen Apoprotein und Coenzym zu betreffen. Hinweise zur Klärung würde eine Analyse der molekularen Eigenschaften bringen. Bekannt ist die Aminosäurezusammensetzung bereits für das Giftenzym (WELLNER und HAYES 1968; DE KOK und RAWITCH 1969; KURTH und AURICH 1973) und für das Säuger-D-Enzym (FONDA und ANDERSON 1969; TU et al. 1973); von YAGI et al. (1974) folgte eine Sequenzanalyse der endständigen D-AOD-Komponente.

*) BOULANGER und OSTEUX (1956)

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit umfaßt Untersuchungen der L- und D-Aminosäure-Oxidase aus Organen zweier Schlangen, Tropidonotus natrix und Cerberus rhynchops (Colubridae). Das D-Enzym aus Acetontrockenpulverpräparaten wird das erste Mal bei Reptilien beschrieben; das L-Enzym wurde für eine umfassendere Charakterisierung aus Lunge und Leber angereichert.

1. Die Aktivität von L-AOD ist in reiner Sauerstoffatmosphäre 90 %, die von D-AOD 60 % höher als in Luft.
2. Die spezifische Aktivität der L-AOD nimmt in den Organen in folgender Reihenfolge ab: Lunge, Leber, Darm, Herz, Blut, Niere; kein Nachweis gelang in Eiern, Hoden, Pankreas/Milz und Fettkörper. Die D-AOD ist nur in drei der untersuchten Organe zu finden: Leber, Niere und Darm; kein Nachweis gelang in Lunge, Blut, Herz, Pankreas/Milz, Eiern, Hoden und Fettkörper.
3. Durch schonende Dialyse gegen KBr dissoziiert das Coenzym der D-AOD; Restaktivität des Apoenzyms noch 25 %. Mit FAD wird 95 % der Aktivität des Holoenzym wiederhergestellt. Das Coenzym der L-AOD dissoziiert nicht; im Gegensatz zu einer normalen Dialyse gegen Puffer bleibt die Aktivität nach Dialyse gegen KBr tagelang erhalten.
4. Die Elektropherogramme der L-AOD zeigen eine einzige enzymaktive Bande, die der D-AOD zeigen ebenfalls nur eine einzige Bande; beide Oxidasen haben die gleiche Molekülgröße und die gleiche negative Nettoladung.
5. Das Molekulargewicht beider Oxidasen wurde mit Hilfe der Diskelektrophorese ermittelt und beträgt $128\ 000 \pm 10\ 000$.

6. Die L-AOD wurde durch fraktionierte Ammonsulfat-fällungen und Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose angereichert; gemessen im Standardansatz von 14 mM L-Phe, 66,7 mM Tris/HCl pH 8 (37°) und 100 % Sauerstoff beträgt die spezifische Aktivität der Leber 5,9 mU/mg Protein, die der Lunge 17,8 mU/mg Protein.
7. Die L-AOD hat ein breites pH-Optimum zwischen pH 7 bis 9; das D-Enzym dagegen ein scharfes pH-Optimum bei pH 8,4.
8. L-Phenylalaninkonzentrationen über 14 mM hemmen geringfügig in 100 % Sauerstoff, vermutlich durch ternäre Komplexe zwischen Substrat, Sauerstoff und Enzym.
9. Die scheinbare Michaeliskonstante für L-Phe und T. natrix-Leber beträgt $1,85 \times 10^{-3}$ M, die für L-Phe und T. natrix-Niere $0,6 \times 10^{-3}$ M und für D-Phe und T. natrix-Leber $1,82 \times 10^{-2}$ M (100 % Sauerstoff, pH 8, 37°C).
10. L-AOD ist inaktiv gegenüber: N-Methyl-D,L-Leucin, L-Prolin, L-Hydroxyprolin und L- α -Hydroxysäuren.
11. Das mit Perchlorsäure abgetrennte Coenzym konnte mit Säuger-D-Aminosäure-Apooxidase als Testenzym sowie Dünnschicht-chromatographisch als FAD identifiziert werden; L-AOD aus Schlangenorgan und -gift hat also das gleiche Coenzym.

LITERATURÜBERSICHT

- ALLEN, J.H. und M.E. BEARD (1965): α -Hydroxy acid oxidase: localisation in renal microbodies.
Science 149, 1507-1509
- ALLEN, J.M., M.E. BEARD und S. KLEINBERGS (1965): The localization of α -Hydroxy acid oxidase in renal microbodies.
J.Exptl.Zool. 160, 329-341
- D'ANIELLO, A. und E. ROCCA (1972): D-Aspartate oxidase from the hepatopancreas of Octopus vulgaris Lam.
Comp.Biochem.Biophys. 41 B, 625-633
- D'ANIELLO, A., R. PALESCANDOLO und V. SCARDI (1975): The distribution of the D-aspartate oxidase activity in cephalopoda.
Comp.Biochem.Physiol. 50 B, 209-210
- ANTONINI, E., M. BRUNORI, M.R. BRUZZESI, E. CHIANCONE und V. MASSEY (1966): Association-dissociation phenomena of D-amino acid oxidase.
J.Biol.Chem. 241, 2358-2366
- AURICH, H., D. LUPPA und G. SCHÜCKER (1972): Reinigung und Eigenschaften der L-Aminosäureoxydase aus Neurospora.
A.Biol.Med.Germ. 28, 209-220
- BALINSKY, J.B. und E. BALDWIN (1962): Comparative studies of waste nitrogen metabolism in amphibia.
Biochem.J. 82, 187-191
- BEARD, M.E. und J.M. ALLEN (1968): A study of properties of renal microbodies of the rat.
J.Exptl.Zool. 168, 477-489

- BENDER, A.E. und H.A. KREBS (1950): The oxidation of various synthetic amino acids by mammalian D-amino acid oxidase, L-amino acid oxidase of Cobra venom and the L- and D-amino acid oxidases of Neurospora crassa. Biochem.J. 46, 210-219
- BLANCHARD, M., D.E. GREEN, V. NOCITO und S. RATNER (1944): L-Amino acid oxidase of animal tissue. J.Biol.Chem. 155, 421-440
- BLANCHARD, M., D.E. GREEN, V. NOCITO und S. RATNER (1945): Isolation of L-amino acid oxidase. J.Biol.Chem. 161, 583-597
- BLASCHKO, H. und J. HAWKINS (1952): D-Amino acid oxidase in the molluscan liver. Biochem.J. 52, 306-310
- BLASCHKO, H. und D.B. HOPE (1956): The oxidation of L-amino acids by Mytilus edulis. Biochem.J. 62, 335-339
- BOULANGER, P. und R. OSTEUZ (1956): Action de la L-amino-acide-déshydrogenase du foie de Dindon (Meleagris gallopavo L.) sur les acides aminés basiques. Biochim.Biophys.A. 21, 552-561
- BOWEN, J.R. und S.F. YANG (1975): Photosensitized deamination of sulfur-amino acids by flavin mononucleotide. Photochem.Photobiol. 21, 201-203
- BROWN, R.S. (1974): Localization of some enzymes in the main venom glands of viperid snakes. J.Morphol. 143, 247-257
- BROWN, R.S., M.B. BROWN, A. BDOLAH und E. KOCHVA (1975): Accumulation of some secretory enzymes in venom glands of Vipera palestinae. Am.J.Physiol. 229, 1675-1679

- BRUNORI, M., G.C. ROTILIO, E. ANTONINI, B. CURTI,
U. BRANZOLI und V. MASSEY (1971): Oxidation-reduction
potentials of D-amino acid oxidase.
J.Biol.Chem. 246, 3140-3144
- BURTON, K. (1951): The L-amino-acid oxidase of Neurospora.
Biochem.J. 50, 258-268
- CHOONG, Y.S., M.G. SHEPHERD und P.A. SULLIVAN (1975):
Preparation of the lactate oxidase apoenzyme and
studies on the binding of flavin mononucleotide to
the apoenzyme.
Biochem.J. 145, 37-45
- CLINE, M.J. und R.I. LEHRER (1969): D-amino acid oxidase
in leukocytes: a possible D-amino acid-linked anti-
mikrobial system.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 62, 756-763
- COLOMBETTI, G., F. LENCI, J.F. McKELLAR und G.O. PHILLIPS
(1975): Light induced effects on a flavoprotein,
D-aminoacid oxidase.
Photochem.Photobiol. 21, 303-306
- COLOWICK, S.P. und N.O. KAPLAN (Eds.) (1971): Methods in
Enzymol. XVII, Part B, 961 S., Academic Press N.Y. und
London.
- CORRIGAN, J.J., D. WELLNER und A. MEISTER (1963): Deter-
mination of D-amino acid oxidase activity in insect
tissues using D-allohydroxyproline as substrate.
Biochim.Biophys.A. 73, 50-56
- CORRIGAN, J.J. (1969): D-Amino acids in animals.
Science 164, 142-149

- CORRIGAN, J.J. (1972): D-Amino acid oxidase: response to a stereospecific challenge.
in: CAMPBELL, J.W. und L. GOLDSTEIN (Eds.), Nitrogen metabolism and the environment. Academic Press
London und N.Y.
- COUDERT, M. und J.-P. VANDECASTEELE (1975): Characterization and physiological function of a soluble L-amino acid oxidase in Corynebacterium.
- COWGILL, R.W. und A.B. PARDEE (Eds.)(1957): Experiments in biochemical research techniques.
Wiley and sons, N.Y. und London
- CROMARTIE, T.H. und C.T. WALSH (1975a): Rat kidney L- α -Hydroxy acid oxidase: Isolation of enzyme with one flavine coenzyme per two subunits.
Biochemistry 14, 2588-2596
- CROMARTIE, T.H. und C.T. WALSH (1975b): Mechanistic studies on the rat kidney flavoenzyme L- α -Hydroxy acid oxidase.
Biochemistry 14, 3482-3490
- CURTI, B., V. MASSEY und M. ZMUDKA (1968): Inactivation of snake venom L-amino acid oxidase by freezing.
J.Biol.Chem. 243, 2306-2314
- DAUGHERTY, J.W. (1955): Intermediary protein metabolism in helminths. III. The L-amino acid oxidases in Hymenolepis diminuta and some effects of change in host physiology.
Exptl.Parasitol. 4, 455-463
- DAVIS, B.J. (1964): Disc elektrophoresis II: Method and application to human serum proteins.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 404-427
- DETERMANN, H. (1967): Gelchromatographie.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-N.Y., 204 S.

DIMANT, E., D.R. SANADI und F.M. HUENNEKENS (1952):

The isolation of flavin nucleotides.

J.Am.Chem.Soc. 74, 5440-5444

DIMITROV, G.D. und K.C. KANKONKAR (1968): Fractionation of Vipera russellii venom by gel filtration. II. Comparative study of yellow and white venoms of V. russellii with special reference to the local necrotizing and lethal actions.

TOXICON 5, 283

DIMITROV, G.D. (1971): Purification and partial characterization of two proteolytic enzymes from the venom of Vipera russellii.

TOXICON 9, 33-44

DIXON, M. und KLEPPE, K. (1965a): D-Amino acid oxidase I. Dissociation and recombination of the holoenzyme. Biochim.Biophys.A. 96, 357-367

DIXON, M. und K. KLEPPE (1965b): D-Amino acid oxidase II. Specificity, competitive inhibition and reaction sequence.

Biochim.Biophys.A. 96, 368-382

DIXON, M. und K. KLEPPE (1965c): D-Amino acid oxidase. III. Effect of pH.

Biochim.Biophys.A. 96, 383-389

DIXON, M. und P. KENWORTHY (1967): D-Aspartate oxidase of kidney.

Biochim.Biophys.A. 146, 54-76

DOMENECH, C.E. und A. BLANCO (1967): Alpha-hydroxy acid oxidases in subcellular fractions from rat kidney.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 28, 209-214

DOMENECH, C.E., E.E. MACHADO de DOMENECH, A. BLANCO (1973): Molecular forms of L- α -hydroxy acid oxidase from rat kidney.

Biochim.Biophys.A. 321, 54-63

DUERRE, J.A. und S. CHAKRABARTHY (1975): L-Amino acid oxidases of Proteus rettgeri.

DUVE, de C. und P. BAUDHUIN (1966): Peroxisomes (Microbodies and related particles).

Physiol.Rev. 46, 323-357

FISHER, F.M.jr. und J.A. STARLING (1970): The metabolism of L-valine by Calliobothrium verticillatum (Cestoda: Tetraphyllidea): Identification of α -keto-iso-valeric acid.

J.Parasitol. 56, 103-107

FONDA, M.L. und B.M. ANDERSON (1967): D-Amino acid oxidase. I, Spectrophotometric studies.

J.Biol.Chem. 242, 3957-3962

FONDA, M.L. und B.M. ANDERSON (1968a): D-Amino acid oxidase. II. Studies of substrate-competitive inhibitors.

J.Biol.Chem. 243, 1931-1935

FONDA, M.L. und B.M. ANDERSON (1968b): D-Amino acid oxidase. III. Studies of flavine adenine dinucleotide binding.

J.Biol.Chem. 243, 5635-5643

FONDA, M.L. und B.M. ANDERSON (1969): D-Amino acid oxidase. IV. Inactivation by maleimides.

J.Biol.Chem. 244, 666-674

FRAENKEL, G. und G.E. PRINTY (1954): The amino acid requirement of the confused flour beetle, Tribolium confusum L.

Biol.Bull. 106, 149-157

GLAHN, P.E., P. MANCHON und J. ROCHE (1955): Sur les L-aminoacideoxydases de l'hépatopancréas des Lamellibranches.

Compt.Rend.Soc.Biol. 149, 509-513

- GOLDSTEIN, Dora B. (1966): D-Amino acid oxidase in brain: distribution in several species and inhibition by pentobarbitone.
J.Neurochem. 15, 1011-1016
- GRILLO RODRIGUEZ, O., H.R. SCANNONE, N.D. PARRA, N.E. GONZALEZ und V. de PREZIOZI (1974): Enzymatic activities and other characteristics of Crotalus durissus cuma-nensis venom.
TOXICON 12, 297-302
- HAND, A.R. (1975): Ultrastructural localization of L- α -hydroxy acid oxidase in rat liver peroxisomes.
Histochemistry 41, 195-206
- HAYES, M.B. und D. WELLNER (1969): Microheterogeneity of L-amino acid oxidase. Separation of multiple components by polyacrylamide gel electrofocusing.
J.Biol.Chem. 244, 66-36-6644
- HEDRICK, J.L. und A.J. SMITH (1968): Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis.
Arch.Biochem.Biophys. 126, 155-164
- HENN, S.W. und G.K. ACKERS (1969): Molecular sieve studies of interacting protein systems. IV. Molecular seize of the D-amino acid oxidase apoenzyme subunit.
J.Biol.Chem. 244, 465-470
- HOPE, D.B., K.C. HORNCastle und R.T. APLIN (1967): The dimerization of Δ^1 -piperidine-2-carboxylic acid.
Biochem.J. 105, 663-667
- HORIIKE, K. und Y. MIYAKE (1971): Some properties of D-Amino-acid apoenzyme from beef kidney.
J.Biochem. 70, 877-879

- HUENNEKENS, F.M., S.P. FELTON (1957): Preparation and enzymatic assay of FAD and FMN.
In: COLOWICK, S.P. und N.O. KAPLAN (Eds.), Methods in Enzymol. III, Academic Press N.Y. S. 950-959
- JAROSZEWICZ, L. (1975): D-Aspartate oxidase in the thyroid gland.
Enzyme 20, 80-89
- JESO, di F. (1968): Ammonium sulfate concentration conversion nomograph for 0°.
J.Biol.Chem. 243, 2022-2023
- JIMENEZ-PORRAS, J.M. (1970): Biochemistry of snake venoms. (A review).
Clin.Toxicol. 8, 389-431
- JOHNSON, P.G., A.P. BELL und D.B. McCORMICK (1975):
Flavin-sensitized photooxidation of histidine.
Photochem.Photobiol. 21, 205-208
- KEARNEY, E.B. und T.P. SINGER (1951a): The L-amino acid oxidases of snake venom. III. Reversible inactivation of L-amino acid oxidases.
Arch.Biochem.Biophys. 33, 377-396
- KEARNEY, E.B. und T.P. SINGER (1951b): The L-amino acid oxidases of snake venom. IV. The effect of anions on the reversible inactivation.
Arch.Biochem.Biophys. 33, 397-413
- KEARNEY, E.B. und T.P. SINGER (1951c): The L-amino acid oxidases of snake venom. V. Mechanism of the reversible inactivation.
Arch.Biochem.Biophys. 33, 414-426
- KEILIN, D. und E.F. HARTREE (1948): Properties of glucose oxidase (Notatin).
Biochem.J. 42, 221-229

- KLEINZELLER, A. (1965): Manometrische Methoden und ihre Anwendung in der Biologie und Biochemie.
Gustav Fischer Verlag Jena, 620 S.
- KOCHOLATY, W.F., E.B. LEDFORD, J.G. DALY und T.A. BILLINGS (1971): Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venoms of Crotalidae, Elapidae and Viperidae.
TOXICON 9, 131-138
- KOCHWA, S., C. PERLMUTTER, S. GITTER, J. RECHNIC und A. de VRIES (1960): Studies on Vipera palestinae venom. Fractionation by ion exchange chromatography.
Am.J.Trop.Med.Hyg. 9, 374-380
- KOK, de A. und C. VEEGER (1967): The effect of light on flavoproteins in the presence of α -keto acids.
Biochim.Biophys.A. 131, 589-591
- KOK, de A. und C. VEEGER (1968): Studies on L-amino acid oxidase. I. Effects of pH and competitive inhibitors.
Biochim.Biophys.A. 167, 35-47
- KOK, de A. und A.B. RAWITCH (1969): Studies on the L-amino acid oxidase. II. Dissociation and characterization of its subunits.
Biochemistry 8, 1405-1411
- KOSTER, J.F. und C. VEEGER (1968): The relation between temperature-inducible allosteric effects and the and the activation energies of amino acid oxidases.
Biochim.Biophys.A. 167, 48-63
- KOTAKA, S. (1963): The L-amino acid oxidase from silk-worm eggs (Bombyx mori L.).
J.Gen.Physiol. 46, 1087-1094
- KREBS, H.A. (1955): Metabolism of amino acids. III. Deamination of amino acids.
Biochem.J. 29, 1620-1644

- KRENITSKY, T.A., J.V. TUUTLE, E.L. CATTAN jr. und
P. WANG (1974): A comparison of the distribution and
electron acceptor specificities of xanthine oxidase
and aldehyde oxidase.
Comp.Biochem.Physiol. 49 B, 687-703
- KUBO, H., Y. YAMANO, M. IWATSUBO, H. WATARI, T. SOYAMA,
T. SHIRAISHI, S. SAWASA, N. KAWASHIMA, S. MITANI und
K. ITO (1958): Sur l'interaction entre l'enzyme et le
co-enzyme dans le système de la déshydrogénase de
l'acide glutamique et celui de l'oxydase des acides
aminés.
Bull.Soc.Chim.Biol. 40, 431-447
- KUSAI, K., I. SEKUZU, B. HAGIHARA, K. OKUNUKI, S. YAMAUCHI
und M. NAKAI (1960): Crystallization of glucose oxidase
from Penicillium amagasakiense.
Biochim.Biophys.A. 40, 555-557
- KURTH, J. und H. AURICH (1975): Purification and some
properties of L-amino acid oxidase from the venom of
sand viper (V. ammodytes).
A.Biol.Med.Germanica 31, 641-653
- LICHTENBERG, L.A. und D. WELLNER (1968): A sensitive
fluorometric assay for amino acid oxidase.
Anal.Biochem. 26, 313-319
- LIN, E.C.C., B.M. PITT, M. GIVEN und W.E. KNOX (1958): The
assay of aromatic amino acid transaminations and keto
acid oxidation by the enol borate-tautomerase method.
J.Biol.Chem. 233, 668-673
- LINEWEAVER, H. und D. BURK (1954): The determination of
enzyme dissociation constants.
J.Am.Chem.Soc. 52, 658-665
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL
(1951): Protein measurement with the Folin phenol
reagent.
J.Biol.Chem. 193, 265-275

- LUPPA, D. und H. AURICH (1971): Kinetische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der L- Aminosäure-oxydase aus Neurospora crassa.
A. Biol.Med.Germanica 27, 839-850
- MARCHI, de W.J. und G.A.R. JOHNSTON (1969): The oxidation of glycine by D-amino acid oxidase extracts of the mammalian central nervous tissue.
J.Neurochem. 16, 355-361
- MARCO, de C. Und C. CRIFO (1967): D-Aspartate oxidase from pig kidney.
Enzymologia 33, 325-330
- MARCO, de C., C. CRIFO, A. RINALDI und M. COLETTA (1969): Distribution of D-aspartate oxidase in liver and kidney of various mammals.
Enzymol.A.Biocatal. 36, 111-116
- MARCO, de C. und A. RINALDI (1972): Oxidative deamination of sulfinyl, sulfonyl and thiosulfonyl amino acids by D-aspartate oxidase.
Eur.J.Biochem. 24, 470-476
- MARCUS, A. und J. FEELEY (1962): The effect of phenazine methosulfate and pyocyanine on the L-amino acid oxidase reaction.
Biochim.Biophys.A. 59, 398-407
- MARKERT, C.L. und F. MOLLER (1959): Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and species specific patterns.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 45, 753-763
- MASSEY, V., G. PALMER und R. BENNETT (1961): The purification and some properties of D-amino acid oxidase.
Biochim.Biophys.A. 48, 1-9

MASSEY, V., H. GANTHER, P.E. BRUMBY und B. CURTI (1965):
D-Amino acid oxidase.

In: KING, T.E., H.S. MASON und M. MORRISON (Eds.),
Oxidases and related redox systems. Wiley and sons,
Vol.I N.Y. und London, 335-358

MASSEY, V. und B. CURTI (1966): A new method of pre-
paration of D-amino acid oxidase apoprotein and a
conformation change after its combination with FAD.
J.Biol.Chem. 241, 3417-3423

MASSEY, V., B. CURTI und H. GANTHER (1966): A temperature-
dependent conformational change in D-amino acid
oxidase and its effect on catalysis.
J.Biol.Chem. 241, 2347-2357

MASSEY, V. und B. CURTI (1967): On the reaction mechanism
of Crotalus adamanteus L-amino acid oxidase.
J.Biol.Chem. 242, 1259-1264

MASSEY, V., B. CURTI, F. MÜLLER und S.G. MAYHEW (1968):
On the reaction of borhydride with D- and L-amino
acid oxidases.
J.Biol.Chem. 243, 1329-1330

MASSEY, V., F. MÜLLER, R. FELDBERG, M. SCHUMAN, P.A.
SULLIVAN, L.G. HOWELL, S.G. MAYHEW, R.G. MATTEWS
UND G.P. FOUST (1969): The reactivity of flavo-
proteins with sulfite. Possible relevance to the
problem of oxygen reactivity.
J.Biol.Chem. 244, 3999-4006

MAURER, H.R. (1968): Disc-Elektrophorese. Theorie und
Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-
Elektrophorese.
Walter de Gruyter und Co., Berlin

- McLEAN, R.L., E.J. MASSARO und W.B. ELLIOTT (1971):
A comparative study of the homology of certain
enzymes in Elapid venoms.
Comp.Biochem.Physiol. 39 B, 1023-1037
- MECHER, T. und J. MASSZI (1969): Presence of L-amino
acid oxidase in the blood of pemphigus, dermatitis
herpetiformis Duhring and herpes zoster.
Clin.Chim.A. 24, 111-120
- MILES, J.L. und R.S. HOLMES (1975): The ontogeny of
L- α -hydroxy acid oxidase isozymes in the mouse.
J.Exptl.Zool. 192, 119-125
- MIZON, J., G. BISERTE und P. BOULANGER (1969): Consti-
tution de la D-amino-acide-oxydase du rein du porc et
préparation du peptide contenant le site actif.
Bull.Soc.Chim.Biol. 51, 419-423
- MÜLLER, M., J.F. HOGG und de DUVE, c. (1968): Distribution
of tricarboxylic acid cycle enzymes between mito-
chondria and peroxisomes in Tetrahymena pyriformis.
J.Biol.Chem. 243, 5385-5395
- NAKANO, M., und T.S. DANOWSKI (1966): Crystalline mammalian
L-amino acid oxidase from rat kidney mitochondria.
J.Biol.Chem. 241, 2075-2083
- NAKANO, M., Y. TSUTSUMI und T.S. DANOWSKI (1967):
Crystalline L-amino acid oxidase from the soluble
fraction of rat-kidney cells.
Biochim.Biophys.A. 139, 40-48
- NAKANO, M., O. TARUTANI und T.S. DANOWSKI (1968a):
Molecular weight of mammalian L-amino acid oxidase
from rat kidney.
Biochim.Biophys.A. 168, 156-157

- NAKANO, M., Y. USCHIJIMA, M. SAGA, Y. TSUTSUMI und
H. ASAMI (1968b): Aliphatic L- α -hydroxyacid oxidase
from rat livers: purification and properties.
Biochim.Biophys.A. 167, 9-22
- NAKANO, M., M. SAGA und Y. TSUTSUMI (1969): Distribution
and immunological properties of rat kidney L-amino
acid oxidase, with a note on peroxisomes.
Biochim.Biophys.A. 185, 19-30
- NAOI, M., A. KOTAKA und K. YAGI (1973): Structure and
function of D-amino acid oxidase.
J.Biochem.(T.) 74, 1097-1105
- NEGELEIN, E. und R. BRÜMEL (1939): Protein der
d-Aminosäureoxydase.
Biochem.Z. 300, 225-239
- NEIMS, A.H., W.D. ZIEVERINK und J. SMILACK (1966):
Distribution of D-aminoacid oxidase in bovine and
human nervous tissues.
J.Neurochem. 13, 163-168
- ORNSTEIN, L. (1964): Disc-electrophoresis I: Background
and theory.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 321-349
- PAIK, W.K. und S. KIM (1965): pH-substrate relationship
of L-amino acid oxidases from snake venom and rat
kidney.
Biochim.Biophys.A. 96, 66-74
- PAIK, W.K. und S. KIM (1967): Studies on the stability
of L-amino acid oxidase of snake venom.
Biochim.Biophys.A. 139, 49-55
- PALMER, G. und V. MASSEY (1968): Mechanisms of flavo-
protein catalysis. In: SINGER, T.P. (Ed.), Biol.
oxidations, Interscience Publ. N.Y., London, 263-300

- PORTER, D.J. und H.J. BRIGHT (1969): Location of hyarogen transfer steps in the mechanism of reduction of L-amino acid oxidase.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 36, 209-214
- PORTER, D.J.T. und H.J. BRIGHT (1972a): Effect of cyanide on the L-amino acid oxidase reaction.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 46, 564-570
- PORTER, D.J.T. und H.J. BRIGHT (1972b): The kinetics of imino acid accumulation in the D-amino acid oxidase reaction.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 46, 571-577
- RAO, N.A., S.P. FELTON und F.M. HUENNEKENS (1967):
Quantitative determination of mitochondrial flavins.
In: COLOWICK, S.P. und N.O. KAPLAN (Eds.), Methods in Enzymol. X, 494-499, Academic Press N.Y. und London
- RAUEN, H.M. (1964): Biochemisches Taschenbuch,
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-N.Y. 1060 u. 1084 S.
- ROBINS, E., N.R. ROBERTS, K.M. EYDT, O.H. LOWRY und D.E. SMITH (1956): Microdetermination of α -keto acids with special reference to malic, lactic and glutamic dehydrogenase in brain.
J.Biol.Chem. 218, 897-909
- ROBINSON, J.C., L. KEAY, R.MOLINARI und I.W. SIZER (1962):
L- α -hydroxy acid oxidases of hog renal cortex.
J.Biol.Chem. 237, 2001-2010
- ROCCA, E. und F. GHIRETTI (1958): Purification and properties of D-glutamic acid oxidase from Octopus vulgaris L.
Arch.Biochem.Biophys. 77, 336-349
- ROCHE, J., N. van THOAI und P.E. GLAHN (1952): Sur la L-amino-acideoxydase de nombreux invertébrés marins.
Experientia 8, 428-429

- ROCHE, J., P.E. GLAHN, P. MANCHON und N. van THOAI
(1959): Sur une nouvelle L-amino-acideoxydase
activable par le magnésium.
Biochim.Biophys.A. 35, 111-122
- ROCK, G.C., A. KHAN und E. HODGSON (1975): The nutritional
value of seven D-amino acids and α -ketoacids for
Argyrotaenia velutinana, Heliothis zea und Pnornia
regina.
J.Ins.Physiol. 21, 693-703
- RUSSELL, F.E., F.W. BUESS, M.Y. WOO und R. EVENTOW (1963):
Zootoxical properties of venom L-amino acid oxidase.
TOXICON 1, 229-234
- SACHS, L. (1968): Statistische Auswertungsmethoden.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-N.Y. 671 S.
- SCANNONE, H., D. WELLNER und A. NOVOGRODSKY (1964):
A study of amino acid oxidase, using a new sensitive
assay.
Biochemistry 3, 1742-1745
- SHAHAM, N. und A. BDOLAH (1973): L-Amino acid oxidase
from Vipera palestinae venom: purification and assay.
Comp.Biochem.Physiol. 46 B, 691-698
- SHIGA, K. und T. SHIGA (1971): The functional difference
between the monomer and the dimer of D-amino acid
oxidase.
Arch.Biochem.Biophys. 145, 701-702
- SHIGA, K., A. ISOMOTO, K. HORIIKE und Y. YAMANO (1973):
A study of the equilibrium between the monomer and the
dimer of D-amino acid oxidase.
J.Biochem.(T.) 74, 481-488

- SINGER, T.P. und E.B. KEARNEY (1950a): The L-amino acid oxidase of snake venom. I. Prosthetic group of the L-amino acid oxidase of Moccasin venom.
Arch.Biochem.Biophys. 27, 348-363
- SINGER, T.P. und E.B. KEARNEY (1950b): The L-amino acid oxidase of snake venom. II. Isolation and characterization of homogenous L-amino acid oxidase.
Arch.Biochem.Biophys. 29, 190-209
- STUMPF, P.K. und D.E. GREEN (1944): L-amino acid oxidase of Proteus vulgaris.
J.Biol.Chem. 153, 387-399
- THEORELL, H. und A.P. NYGAARD (1954): Kinetics and equilibria in flavoprotein systems. II. The effects of pH, anions and temperature on the dissociation and reassociation of the old yellow enzyme.
A.Chem.Scand. 8, 1649-1658
- TU, S.-C., S.J. EDELSTEIN und D.B. McCORMICK (1973): A modified purification method and properties of pure D-amino acid oxidase.
Arch.Biochem.Biophys. 159, 889-896
- TU, S.-C. und D.B. McCORMICK (1973): Photoinactivation of porcine D-amino acid oxidase with flavin adenine dinucleotide.
J.Biol.Chem. 248, 6339-6347
- UMBREIT, W.W., R.H. BURRIS und J.F. STAUFFER (1957):
Manometric techniques.
Burgess Publ.Comp., Minneapolis 3rd Ed.
- USHIJIMA, Y. und M. NAKANO (1969): Aliphatic L- α -Hydroxy-acid oxidase from rat livers. II. A flavoprotein.
Biochim.Biophys.A. 178, 429-433

- URICH, K. (1968): D-Glutamat oxydase aus der Antennendrüse des Flußkrebse Orconectes limosus: Reinigung und Charakterisierung.
Z.Naturforsch. 23 b, 1508-1511
- VAN THOAI, N., J. ROCHE und Y. ROBIN (1953): Dégénération de l'arginine chez les invertébrés marins.
Biochim.Biophys.A. 11, 403-411
- VILLELA, G.G., E. MITIDIERI und L.P. RIBEIRO (1955): Flavoproteins in the blood plasma of the Brazilian snake Bothrops jaraca.
Arch.Biochem.Biophys. 56, 270-273
- VILLELA, G.G. und M. THEIN (1967): Riboflavin in the blood serum, the skin and venom of snakes of Burma.
Experientia 23, 722.
- WALAAS, E. und O. WALAAS (1956): Kinetics and equilibria in flavoprotein systems. V. The effect of pH, anions and partial structural analogues of the coenzyme on the activity of D-amino acid oxidase.
A.Chem.Scand. 10, 122-133
- WALDMAN, R.H. und H.B. BURCH (1963): Rapid method for study of enzyme distribution in rat kidney.
Am.J.Physiol. 204, 749
- WALSH, C.T., A. SCHONBRUNN und R.H. ABELLES (1971): Studies on the mechanism of action of D-amino acid oxidase. Evidence for the removal of substrate α -hydrogen as a proton.
J.Biol.Chem. 246, 6855-6866
- WARBURG, O. und W. CHRISTIAN (1938a): Co-ferment der D-Alanin-Oxydase.
Biochem.Z. 296, 294.
- WARBURG, O. und W. CHRISTIAN (1938b): Isolierung der prosthetischen Gruppe der d-Aminosäureoxydase.
Biochem.Z. 298, 150-168

- WEBER, K. und M. OSBORN (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J.Biol.Chem. 244, 4406-4412
- WELLNER, D. und A. MEISTER (1960): Crystalline L-amino acid oxidase of Crotalus adamanteus.
J.Biol.Chem. 235, 2013-2018
- WELLNER, D. und A. MEISTER (1961): Studies on the mechanism of action of L-amino acid oxidase.
J.Biol.Chem. 236, 2357-2364
- WELLNER, D. (1966): Evidence of conformational changes in L-amino acid oxidase associated with reversible inactivation.
Biochemistry 5, 1585-1591
- WELLNER, D. und M.B. HAYES (1968): Multiple molecular forms of L-amino acid oxidase.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 151, 118-132
- YAGI, K., T. OZAWA und M. HARADA (1959): Changes of absorption spectrum of flavin adenine dinucleotide by its binding with both D-amino acid oxidase apoprotein and benzoate.
Nature 184, 1938-1939
- YAGI, K., T. OZAWA und T. OOI (1961): Molecular weight and configuration of D-amino acid oxidase protein.
Biochim.Biophys.A. 54, 199-201
- YAGI, K. und T. OZAWA (1962a): Complex formation of apo-coenzyme and substrate of D-amino acid oxidase. II. Spectrophotometric analysis using a substrate-substitute.
Biochim.Biophys.A. 56, 413-419

- YAGI, K. und T. OZAWA (1962b): Complex formation of apo-coenzyme and substrate of D-amino acid oxidase. II. Crystallization of artificial Michaelis complexes. Biochim.Biophys.A. 56, 420-426
- YAGI, K. (1962): Chemical determination of flavins. In: GLICK, D.(Ed.), Methods of Biochem.Anal. X, 319-356, Interscience Publ. (J.Wiley and sons, N.Y.)
- YAGI, K. und T. OZAWA (1964a): I. Flavin content of D-amino acid oxidase. J.Biochem.(T.) 55, 197-198
- YAGI, K. und T. OZAWA (1964b): II. Crystallization of an intermediate in the reaction of D-amino acid oxidase and lactate. J.Biochem.(T.) 55, 682-684
- YAGI, K., M. NAOI, M. HARADA, K. OKAMURA, H. HIDAKA, T.OZAWA und A. KOTAKI (1967): Structure and function of D-amino acid oxidase. J.Biochem.(T.) 61, 580-597
- YAGI, K., T. OZAWA und M.NAOI (1969): Mechanism in enzyme reaction. V. Demonstration of an initial step of enzyme-substrate complex using D-amino acid oxidase and D-Lactate or D-mandelate. BiochimBiophys.A. 185, 31-38
- YAGI, K., M. NISHIKIMI, N. OHISHI und A. TAKAI (1970b): Kinetic behavior of D-amino acid oxidase in its reaction with basic amino acids. J.Biochem.(T.) 67, 153-155
- YAGI, K. und OHISHI (1970c): Effect of light on the purple complex of D-Amino acid oxidase. J.Biochem.(T.) 67, 599-601
- YAGI, K., N. SUGIURA, H.OHAMA und A. KOTAKI (1970d): A simple purification method of D-amino acid oxidase. J.Biochem.(T.) 68, 573-575

- YAGI, K. (1971a): Reaction mechanism of D-amino acid oxidase. In: *Advances in Enzymol.* 34, 34-78, F.F. NORD (Ed.), Interscience N.Y.
- YAGI, K. (1971b): D-amino acid oxidase and its complexes (hog kidney).
In: COLOWICK, S.P. und N.O. KAPLAN (Eds.), *Methods in Enzymol.* XVII B, 608-622, Academic Press N.Y.
- YAGI, K., M. NISHIKIMI, A. TAKAI und N. OHISHI (1970): Mechanism of enzyme reaction. VI. Kinetic isotope effect on D-amino acid oxidase reaction.
Biochim.Biophys.A. E 46, 64-71
- YAGI, K., N. SUGIURA, M. MIZUNO, T. HIRAYAMA, H.KAGAMIYAMA, T. YAMANO (1974): Primary structure of the N-terminal portion of D-amino acid oxidase.
J.Biochem.(T.) 76, 1369-1371
- YUSKO, S.C. und A.H. NEIMS (1973): D-Aspartate oxidase in mammalian brain and choroid plexus.
J.Neurochem. 21, 1037-1039
- ZELLER, E.A. und A. MARITZ (1944): Über eine neue L-Aminosäureoxydase. (1.Mitteilg.)
Helv.Chim.A. 27, 1888-1901
- ZELLER, E.A. und A. MARITZ (1945a): Über eine neue L-Aminosäureoxydase (Ophio-L-aminosäureoxydase). (2.Mittlg.)
Helv.Chim.A. 28, 365-379
- ZELLER, E.A., A. MARITZ und B. ISELIN (1945b): Über eine neue L-Aminosäureoxydase (Ophio-L-aminosäureoxydase) (3. Mitteilg.).
Helv.Chim.A. 28, 1615-1627
- ZELLER, E.A., B. ISELIN und A. MARITZ (1946): Über das Vorkommen der Ophio-L-aminosäureoxydase. (4.Mittlg.).
Helv.Physiol.A. 4, 233-248

- ZELLER, E.A. (1948): Enzymes of snake venoms and their biological significance. In: NORD, F.F. (Ed.), Advances in Enzymol. VIII, 459 Interscience Publ.N.Y.
- ZELLER, E.A. (1951): Enzymes as essential components of bacterial and animal toxins.
In: SUMNER, J.B. und K. MYRBACK (Eds.), The Enzymes I, Prt.II, 986-1013, Academic Press N.Y.
- ZELLER, E.A., G. RAMACHANDER, G.A. FLEISHER, T. ISHIMARU und V. ZELLER (1965): Ophidian L-amino acid oxidase. The nature of the enzyme-substrate complexes.
Biochem.J. 95, 262-269
- ZELLER, E.A., L.M. CLAUSS und J.T. OHLSSON (1974):
Interaction of ophidian L-amino acid oxidase with its substrates and inhibitors: role of molecular geometry and electron distribution.
Helv.Chim.A. 57, 2406-2420
- ZWISLER, O. (1965): Über eine L-Aminosäureoxydase aus Gift der Vipera ammodytes.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 343, 178-184
- ZWISLER, O. und H. BIEL (1966): Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamidgel. I.Mitteilung: Einfluß verschiedener Elektrophoresebedingungen auf die Auflösung von Humanserum.
Z.Clin.Chem. 4, 58-62

LEBENSIAUF

Geboren wurde ich, Gisela Wolfram, am 3. Mai 1943 in Berlin als einzige Tochter des früheren preußischen Oberverwaltungsgerichtsrates Joseph Wolfram und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Müller.

Am 1. Juli 1945 starb mein Vater, meine Mutter wurde wieder berufstätig.

Vom 1. September 1949 bis Ostern 1953 besuchte ich die 17. Grundschule in Berlin-Friedenau und anschließend die Luisenstiftung, ein neusprachliches Gymnasium in Berlin-Dahlem; dort machte ich 1962 das Abitur.

Seit dem SS 1962 bin ich an der Freien Universität Berlin mit Hauptfach Zoologie immatrikuliert; im November 1966 bestand ich die Diplom-Vorprüfung. Im Sommer 1967 begann ich mit den Vorarbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Institut für Tierphysiologie der FU Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Urich.

Meine akademischen Lehrer waren in Zoologie die Professoren Brandenburg, Günther, Kümmel, Peus, Frau Richter, Ulrich und Urich, in Botanik die Herren Professoren Eckardt und Reinert. Genetik hörte ich bei Herrn Prof. Lüers, Physik bei Prof. Lassen, Chemie bei den Herren Professoren Jahr, Manecke, Plieth und Mathematik bei Professor Überreiter.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30